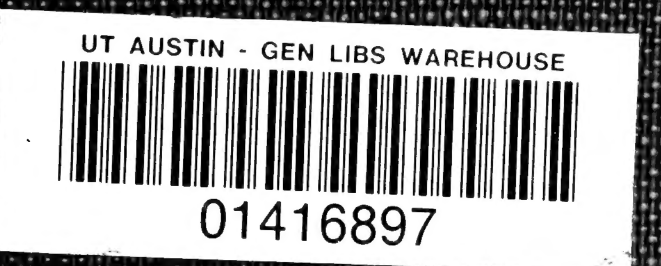
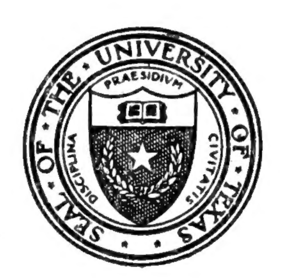

UT AUSTIN - GEN LIBS WAREHOUSE
01416897


THE UNIVERSITY OF TEXAS
SEAL OF
PRAESIDIVM
DISCIPLINA
CIVITATIS

T. XXXV. — 1921. Janvier — N° 1.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921.	France	**45 fr.**
— — — —	Union Postale.	**55 fr.**
Prix du numéro, — —		**4 fr.**

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées.
Les annees 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément **28** francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément.
Tables des Matières années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° I

Pages.

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS. — L. MARETHEUX, IMPRIMEUR, 1, RUE CASSETTE.

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDEES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

TOME TRENTE-QUATRIÈME
1920

AVEC 21 PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

35e ANNÉE — JANVIER 1921 — N° 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DE L'URÉASE DU SOJA SUR L'ORGANISME ANIMAL

par P. CARNOT, P. GÉRARD et Mlle S. MOISSONNIER

Vauquelin, en 1825, avait découvert l'hydratation spontanée de l'urée en carbonate d'ammoniaque dans les milieux d'origine animale. Pasteur, en 1860, observait ce même phénomène sous l'influence des micro-organismes. Des études plus approfondies, poursuivies par Masculer, 1898, puis Miquel, montraient que cette hydratation était l'œuvre d'une diastase, l'*uréase*, sécrétée par les micro-organismes. Successivement Shibata et Hofmeister, en 1904, et Tokenchi, en 1909, découvraient la présence de l'uréase dans les végétaux. En 1913, Armstrong et Horton reconnaissaient l'action strictement spécifique de l'uréase retirée du soja. Cette diastase, en effet, ne peut agir que sur l'urée, alors qu'elle est incapable d'hydrolyser des corps même très voisins de l'urée (urée substituée, acides aminés). Depuis, de nombreux auteurs ont étudié l'uréase. Fosse, en France, dans un important et très intéressant mémoire sur l'origine et la distribution de l'urée dans la nature, a essayé de définir le rôle physiologique de l'uréase dans les végétaux, cependant qu'en Amérique on s'attachait plutôt à connaître de façon précise son action *in vitro* sur l'urée dans des conditions de milieux différents. La très grande

activité de cette diastase, la facilité de sa préparation incitèrent les auteurs, et en particulier Folin, à s'en servir comme d'un moyen de dosage de l'urée dans les liquides de l'organisme et, depuis ce moment, innombrables sont les méthodes de dosage de l'urée, publiées par les élèves de Folin, qui utilisèrent l'action urolytique de cette diastase.

Les mêmes raisons qui avaient poussé les auteurs à utiliser l'uréase pour doser l'urée nous engagèrent à faire l'étude de ce ferment *in vivo*. En effet, sa grande résistance en milieu sanguin, son peu de sensibilité aux produits d'hydrolyse de l'urée, la facilité de dosage de l'élément attaqué par l'uréase et de l'ammoniaque produit devaient en faire, *a priori*, une excellente diastase d'étude *in vivo*. Grâce à la précieuse méthode de Fosse pour le dosage de l'urée par le xanthydrol, nous allons pouvoir suivre avec précision l'action et l'évolution de cette diastase introduite dans l'organisme; le dosage simultané de l'NH^3 dans le sang et les tissus nous permettent, d'autre part, de définir avec précision le mécanisme des accidents toxiques.

I. — Techniques de préparation.

La préparation de la solution diastasique dont nous nous servions pour injections est très simple. Nous employons de la farine de haricot de soja bien tamisée et fine, qu'ont bien voulu nous procurer MM. Heudebert et Chevalier avec une obligeance dont nous les remercions; puis nous la mêlons à de l'eau dans une proportion de 1 à 10. Après avoir agité trois fois à vingt minutes d'intervalle, on met à filtrer ce mélange au bout d'une heure de macération et l'on obtient un liquide clair, légèrement opalescent, d'une grande activité diastasique.

Conservation. — On peut conserver cette macération à la température du laboratoire (18°-20°) pendant deux ou trois jours sans que son titre baisse de façon appréciable; si l'on a soin d'ajouter à ce filtrat soit quelques cristaux de thymol, soit quelques centimètres cubes de toluène qui n'entravent nullement l'action diastasique.

Purification. — Comme le procédé simple que nous



employons pour la préparation de la diastase nous donnait un liquide où un grand nombre de corps se trouvait entraîné en même temps que l'uréase, nous avons essayé de purifier notre diastase. Nons avons, pour cela, suivi les méthodes classiques que nous allons examiner :

1° *Précipitation de la macération à 10 p. 100 par de l'alcool-éther à parties égales.* On ajoute à 10 parties de macération 90 parties d'alcool-éther : après une vive agitation et une filtration sur le vide, on récupère la diastase précipitée et, après l'avoir bien exprimée entre deux feuilles de papier filtre, on la sèche définitivement sur des assiettes à la température du laboratoire. De tous les précipitants essayés (alcool, acétone, alcool-éther, alcool-acétone), c'est l'alcool-éther à parties égales qui nous a donné le meilleur résultat au point de vue de la facilité de la préparation et de la conservation de l'activité diastasique. Cette purification est évidemment imparfaite : car elle n'enlève qu'une partie des impuretés; des albumines végétales dissoutes par l'eau sont, en effet, précipitées par l'addition d'alcool-éther et redissoutes à nouveau quand on reprend le précipité par l'eau. Néanmoins, lors de cette reprise, on constate une grande part d'insoluble et l'on sépare par centrifugation un assez volumineux précipité. Le pouvoir diastasique du liquide clair surnageant est malheureusement diminué de moitié par ce traitement. Si l'on tente une seconde purification par une nouvelle précipitation, le pouvoir diastasique est presque complètement détruit.

Mesure de l'activité de la diastase. — Pour injecter aux chiens des liquides de pouvoir diastasique comparable, nous avons décidé de définir ainsi la valeur de notre liquide diastasique. Nous exprimons en milligrammes l'N.NH^3 produit par 1 cent. cube de macération filtrée aux dépens de 5 cent. cubes d'une solution d'urée à 1 p. 100 en une heure d'étuve à 37°. Les activités moyennes sont comprises entre 12 et 16 pour les macérations, entre 6 et 10 pour les diastases purifiées par précipitation. Lorsque nous faisons une injection aux animaux, nous faisons toujours entrer en ligne de compte l'activité de la diastase et le poids de l'animal. Si, pour un chien de 10 kilos, on injecte 50 cent. cubes de diastase de pouvoir 16, on injecte

$\frac{16 \times 50}{10} = 80$ de pouvoir diastasique par kilogramme. Si à un chien de 5 kilogrammes on veut injecter une dose comparable de diastase, alors que le liquide diastasique n'a qu'une activité de 8 au lieu de 16, on injectera une quantité de liquide suffisante pour avoir 80 de pouvoir diastasique par kilogramme, c'est-à-dire 50 cent. cubes. En effet $\frac{50 \times 8}{5} = 80$. De ce fait les expériences sont comparables entre elles.

Stérilisation de la diastase. — Comme nous avions des injections à faire chez des chiens qui ne mouraient pas rapidement des suites de ces injections, il était indispensable d'injecter des liquides diastasiques stériles. Pour ce faire, nous avons étudié deux méthodes qui ne nous ont donné, d'ailleurs, que des résultats imparfaits.

1° La *filtration sur bougie Chamberland*. La macération à 10 p. 100 laisse passer assez rapidement un liquide dont l'activité est abaissée des deux tiers.

2° La *stérilisation par l'alcool* se fait au cours des opérations de purification par l'alcool-éther : on reprend le précipité par de l'alcool pur et on conduit, à partir de ce moment, les opérations de façon aseptique. On centrifuge, dans un tube stérile, on décante l'alcool et place le tube bouché avec son coton dans une cloche à vide. On évapore aussi bien que possible l'alcool contenu dans le tube à centrifuger, puis on reprend par une quantité appropriée d'eau stérile, on centrifuge à nouveau et c'est le liquide surnageant qui sert à l'injection. L'activité diastasique ne se trouve abaissée de ce fait que de moitié et la stérilisation du liquide est plus parfaite que par la filtration sur bougie Chamberland.

Atténuation du pouvoir diastasique. — Désirant, au cours de nos expériences, utiliser comme contre-épreuve un liquide de macération dont seul le pouvoir diastasique aurait été annihilé, cependant que tous les autres corps constituants auraient été respectés, nous avons cherché à détruire ce pouvoir diastasique. Un seul moyen nous a pleinement réussi, c'est le chauffage à 90° au bain-marie pendant dix minutes. Le liquide de

macération devient complètement inactif, sans précipiter pour cela. Malheureusement le chauffage à 90° est un peu brutal et peut détruire ou modifier la composition de toxalbumines présentes dans la macération et dont nous aurions voulu conserver les effets. Par les autres procédés employés nous ne sommes arrivés qu'à des atténuations sans destruction de l'uréase.

Nous avons tout d'abord étudié le $(CN)^2Hg$ qui inactive complètement la diastase à la dilution de 1/1.000.

Diastase	Urée 1 p. 100	N.NH³ produit
0,5 (cyanure à 1/1.000). .	5	0,00
0,5 — 1/5.000). .	5	0,0014
0,5 — 1/10 000) .	5	0,0028
0,5 témoin.	5	0,0226

Au taux de 1/10.000 son activité est encore à peu près nulle : mais, dès qu'elle est introduite dans l'économie, la dilution extrême à laquelle la diastase est portée lui permet de reprendre, malgré la présence de $(CN)^2Hg$, son activité première.

Nous avons essayé ensuite l'addition de quantités ménagées de bases ou d'acides jusqu'à précipitation du liquide; on laissait en contact plus ou moins longtemps, puis on neutralisait à nouveau soit avec la soude, soit avec l'acide. Nos additions de bases ou d'acides produisaient un volumineux précipité dans la macération et modifiaient de ce fait profondément les corps que nous voulions respecter avant d'avoir touché au pouvoir diastasique qui, après neutralisation, se montrait aussi actif qu'avant le traitement.

II. — Action de la diastase *in vitro* sur les humeurs de l'organisme.

Avant de procéder à des injections de diastase sur des animaux, nous avons étudié les modifications que pouvait subir son action en présence des produits de l'organisme. Nous avions, d'ailleurs, été précédés dans cette voie par de nombreux auteurs qui s'étaient servis de cette diastase comme d'un moyen de dosage de l'urée dans le sang et les tissus (Folin, Summer, etc.). L'uréase attaque avec facilité et une grande rapidité l'urée

contenue dans les liquides et les tissus de l'organisme pour la transformer complètement en carbonate d'ammoniaque.

Rôle protecteur du sang et du sérum sur l'activité de la diastase. — A ce propos nous avons observé que le sérum sanguin joue *un rôle protecteur vis-à-vis de la diastase*. En étudiant l'action de la dilution sur l'activité diastasique, si l'on met en contact une certaine quantité de diastase et une certaine quantité d'urée et si l'on augmente par addition d'eau le volume total, on observe que plus le volume augmente (autrement dit, plus la dilution de la diastase est grande), plus l'activité de cette dernière diminue. Si, mettant en contact les mêmes quantités de diastase et d'urée et procédant aux mêmes dilutions, on prend soin d'ajouter une quantité donnée de sérum sanguin, la dilution n'a plus d'influence sur l'activité qui reste identique à elle-même ou peut même se trouver augmentée. Nous avons cherché quelle pouvait être la cause de cette influence protectrice du sérum.

Nous avons tout d'abord pensé à l'action favorisante d'un corps thermolabile et nous avons remplacé le sérum normal par du sérum chauffé à 56°, puis par du sérum chauffé à 65°. Ces deux sérums chauffés ont manifesté les mêmes propriétés que le sérum normal.

Pensant alors que c'était la réaction alcaline qui intervenait, nous avons remplacé le sérum par des quantités de NaOH inférieures, égales et supérieures à l'alcalinité du sérum. Cette alcalinité étant dosée, grossièrement il est vrai, par SO^4H^2 1/10N en présence d'hélianthine, nous n'avons constaté aucune protection de l'action diastasique. Nous avons eu de meilleurs résultats en introduisant une légère acidité sous forme de Po^4H^2K. La diastase perd moins son activité quand on la dilue.

Il était logique de penser que le NaCl pouvait jouer un rôle : car son action favorisante sur les diastases, en particulier sur la lipase, a été maintes fois démontrée. Nous avons, dans une première expérience, remplacé le sérum par une solution de NaCl représentant des quantités inférieures, égales et supérieures aux quantités de NaCl contenues dans le sérum mis en expérience. Ceci ne nous a donné aucun résultat positif. Nous avons alors, dans une seconde expérience,

mis à dialyser du sérum à travers un sac de collodion jusqu'à ce que le liquide de dialyse soit complètement privé de NaCl. De cette façon nous avions un sérum privé de NaCl que nous avons essayé en même temps qu'un sérum non dialysé : nous avons obtenu les mêmes résultats avec les deux sérums. Ceci venait confirmer la première expérience et prouver que l'action du NaCl n'entrait pas en ligne de compte.

Par élimination nous devions admettre que c'est le sérum-albumine qui joue un rôle protecteur, et nous avons essayé d'obtenir les mêmes résultats avec de l'ovalbumine. Nous avons mis en expérience des quantités à peu près comparables en poids d'ovalbumine et de sérum-albumine et nous avons obtenu une protection de la diastase très nette, inférieure néanmoins avec l'ovalbumine. La sérum-albumine est plus protectrice.

Les tableaux suivants résument nos expériences. Nous avons toujours mis en expérience 0 c. c. 5 de macération diastasique de titre connu et semblable; on faisait agir sur 0 gr. 032 d'N uréique pendant deux heures à l'étuve à 37° en présence de toluène. Nous avons alors étudié l'action diastasique de ces 0 c. c. 5 de diastase dilués dans 5 cent. cubes de liquide total (diastase non diluée) et dilués dans 30 cent. cubes de liquide total (diastase diluée). Nous nous sommes tenus à ces deux dilutions pour ne pas compliquer les chiffres et les rendre compréhensibles. Le tableau que nous donnons est un tableau récapitulatif qui condense en un seul chiffre la moyenne de plusieurs expériences :

	Diastase pure témoin	+ NaOH 1/10 N 7 c.c. 7	+ PO^4H^2K = 0 gr. 15	+ NaCl = 0,0001 à 0,010
Diastase 0,5 non diluée H^2O q. s. p. (5 c. c.)	0,009	0,0091	0,0095	0,009
Diastase 0,5 diluée H^2O q. s. p. (30 c. c.)	0,0014	0,0007	0,0035	0,0007

Dans ce tableau on constate la seule action protectrice du PO^4H^2K qui, malgré la dilution aqueuse, a pu conserver à la diastase une activité nettement supérieure. Un autre fait curieux à remarquer aussi est que la diastase non

diluée produit du carbonate d'ammoniaque en fonction du temps d'étuve: ainsi 0 c. c. 5 de diastase produisent 0,004 d'N.NH^3 en une heure et 0,009 en deux heures quand la dilution ne dépasse pas 5 cent. cubes; si nous atteignons la dilution de 30, la diastase produit 0,0012 en une heure et seulement 0,0014 en deux heures. Ce phénomène s'est reproduit quels que soient les corps ajoutés : en solution diluée la diastase produit en une heure la presque totalité de l'N.NH^3 qu'elle fournira définitivement.

Dans un second tableau, nous avons réuni nos essais faits avec le sérum :

		+ SÉRUM					
	Diastase pure témoin	1 c. c.	chauffé à 56° 1 c. c.	chauffé à 65° 1 c. c.	0 c. c. 5	dialysé 1 c. c.	Albumine d'œuf
	—	—	—	—	—	—	—
Diastase 0,5 non diluée (5 c. c.)	0,007	0,007	0,012	0,013	0,007	0,008	0,007
Diastase 0,5 diluée (10 c. c.)	0,00027	0,012	0,012	0,014	0,010	0,011	0,004

On voit qu'après dilution l'activité est pleinement conservée, quel que soit le sérum employé, qu'il soit chauffé à 56-65° ou non, ou privé de NaCl. Il est même à remarquer que les sérums chauffés à 56 et 65° étaient plus visqueux et paraissent avoir été, de ce fait, de meilleurs protecteurs de la diastase. L'ovalbumine s'est comportée de la même façon que le sérum, quoique moins nettement. Il est bien entendu que tous ces chiffres sont donnés, alcalinité du témoin déduite.

III. — Destinée de l'uréase injectée dans l'organisme.

a) Résistance de la diastase dans l'organisme. — Un des principaux points auxquels nous nous sommes attachés a été de savoir quelles étaient les destinées de la diastase, une fois que celle-ci était introduite dans l'organisme. Combien de temps restait-elle active, quels étaient les organes où il était possible de déceler sa présence? Nous commencerons par présenter les recherches que nous avons faites après les *injections intraveineuses*, qui donnent les résultats les plus nets et les plus intéressants.

Pour reconnaître la présence de la diastase dans le sang ou dans un organe, nous mesurions son activité diastasique dans des conditions bien déterminées que nous allons décrire. Pour la recherche dans le sang, nous opérions toujours avec le sérum ; car celui-ci, étant incolore, nous permettait de faire des dosages volumétriques en présence d'hélianthine, ce qui simplifie beaucoup la méthode du dosage de l'ammoniaque. On prend 1 cént. cube de sérum que l'on met en contact avec 5 cent. cubes d'une solution d'urée à 1 p. 100 et 1 cent. cube de toluène comme antiseptique; on laisse à l'étuve pendant vingt-quatre heures à 37°; après quoi, on dose par SO^4H^2 1/10N, en présence d'hélianthine, la quantité d'$N.NH^3$ produit et l'on exprime les résultats en milligrammes d'$N.NH^3$ après avoir évidemment déduit de ces résultats l'alcalinité représentée par le sérum.

Dans le sang normal nous n'avons jamais trouvé d'action urolytique spontanée, tout au moins sensible à nos procédés d'investigation.

Nous mentionnerons trois expériences où nous avons cherché, de demi-heure en demi-heure, ce que devenait la diastase dans l'organisme, ou, tout au moins, comment se comportait l'activité diastasique du sang chez le chien injecté. Dans les deux premiers cas, nous avons injecté 60 cent. cubes de diastase, d'activité 12, à des chiens pesant 10 kilogrammes. Leur sang a été essayé avant l'injection au point de vue du pouvoir urolytique, puis essayé de demi-heure en demi-heure après l'injection. Le tableau suivant rendra compte des variations de l'activité diastasique.

	1re EXPÉRIENCE activité	2e EXPÉRIENCE activité
Sang avant l'injection	0	0
— 1/2 heure après	12,8	13
— 1 heure après	10	7,9
— 1 h. 1/2 après	7,5	5
— 2 h. 1/2 après	6	5

La troisième expérience n'a pas été faite exactement dans les mêmes conditions; l'activité diastasique a été prise en laissant

le sang deux heures à l'étuve au lieu de vingt-quatre heures. Les chiffres absolus sont moins forts; mais ils restent comparables entre eux et c'est là l'essentiel. Nous étions, d'ailleurs, forcés d'agir ainsi; car nous voulions suivre, en même temps, l'évolution de l'activité diastasique *in vivo* et *in vitro*. Pour ce faire, nous avons procédé de la sorte : Nous avons injecté à un chien de 22 kilogrammes 130 cent. cubes d'une diastase d'activité 12. Après une demi-heure, nous avons prélevé du sang; nous avons, après centrifugation, fait deux parties du sérum prélevé : une partie a été examinée immédiatement au point de vue de son activité diastasique; une autre partie a été abandonnée *in vitro* et, de demi-heure en demi-heure, nous avons suivi l'évolution de son activité diastasique. Nous avions donc, concurremment, deux expériences qui se poursuivaient : car, à chaque fois que nous prenions du sang au chien pour examiner l'activité diastasique de son sang, nous avions un point de comparaison avec l'activité diastasique du sang prélevé une demi-heure après l'injection et resté *in vitro*. On remarquera que, *in vivo*, la destruction s'est produite plus rapidement que *in vitro*. Si on mélange du sérum déjà prélevé depuis un certain temps (24 à 48 heures) sur l'animal et de la diastase, on remarque que l'activité diastasique subit une atténuation nulle et qui n'est nullement comparable à l'atténuation produite par le sang *in vivo*.

Ces expériences paraissent mettre en évidence l'action antidiastasique du milieu sanguin vivant, action qu'il serait intéressant d'opposer à l'action protectrice que ce même sérum exerce sur la diastase *in vitro* quand on dilue celle-ci avec de l'eau. Cette seconde action est, d'ailleurs, d'un ordre tout à fait différent; et, comparable dans ses effets (qui se manifestent par une production plus ou moins grande d'$N.NH^3$ aux dépens de l'urée), elle n'est plus comparable au point de vue mécanisme de son action. Dans le premier cas, on pense avoir affaire à une action d'anticorps, action vitale; dans le deuxième cas, à une action purement physique ou physicochimique.

Le tableau suivant résume les résultats trouvés et montre la très légère activité antidiastasique du sang *in vivo*.
TxU

—	A Sérum	B Sérum prélevé après une 1/2 h. et conservé ensuite *in vitro*	C Sérum prélevé depuis 48 heures et mélangé à de la diastase *in vitro*
Sang avant l'injection. .	0	0	0
— 1/2 heure après. .	2,0	2,0	2,0
— 1 heure après . . .	1,8	2,0	2,0
— 1 h. 1/2 après. . .	1,8	2,0	2,0
— 2 heures après . .	1,4	2,0	2,0
— 2 h. 1/2 après. . .	1,1	1,8	2,0
— 24 heures après. .	»	»	2,0

Une seconde hypothèse, plus vraisemblable, de la diminution d'activité diastasique du sang *in vivo* serait que cette diminution provient de ce que la diffusion de la diastase dans l'organisme se fait lentement. Cependant il semblerait qu'en faisant le prélèvement une demi-heure après l'injection de diastase, on ait laissé à celle-ci le temps de se répartir également dans tout le milieu liquide. Il est probable que la diastase ne diffuse dans l'organisme que très lentement. Le milieu liquide d'un animal a un poids qui égale environ 64 p. 100 de son poids total. Notre chien pesant 22 kilogrammes, le milieu liquide total égalerait 14 kilogrammes; comme nous avons injecté 130 cent. cubes de liquide diastasique, notre dilution de diastase serait d'environ 1/100, la diffusion une fois terminée. Or des comparaisons d'activité, faites une demi-heure après l'injection, entre le sang de l'animal injecté et des dilutions de diastase dans le sérum du même animal (prélevé avant l'injection), nous ont montré que la dilution de la diastase dans l'organisme était égale environ à une dilution au 1/20 de la diastase dans le sérum. La théorie voulant que ce chien ait environ 2.000 cent. cubes de sang en tout, le calcul nous amène à penser que notre animal, ayant reçu 130 cent. cubes de diastase, a dans ses veines une dilution de la diastase au 1/15 environ. Chiffre beaucoup plus raisonnable et qui se rapproche de la dilution trouvée expérimentalement comme égale au 1/20; chiffre, par contre, qui n'est nullement comparable à ceux obtenus quand on calcule par rapport au milieu liquide total du chien, ce qui donne une dilution de l'ordre de 1/100. Il semble donc logique de conclure

que la diastase, mêlée immédiatement et intimement à la masse sanguine, diffuse lentement dans l'organisme. L'action antidiastasique nulle du sang *in vitro* et (comme nous le verrons plus tard) des organes semble confirmer cette hypothèse.

b) Fixation de la diastase dans les organes. — Après les injections intraveineuses, nous avons fait de nombreuses recherches pour trouver les organes qui fixaient le pouvoir diastasique de la macération injectée. Voici la technique que nous avons suivie pour faire cette recherche. Dès la mort de l'animal, les organes étaient prélevés et finement broyés. L'animal ayant été tué par saignée à blanc, les organes étaient déjà presque complètement privés de sang. On procédait à un lavage rapide pour débarrasser l'organe du plus possible de son sang. Puis, après l'avoir broyé avec du sable, on le mettait en contact (1 gramme d'organe) avec une solution d'urée à 1/100 et du toluène. Au bout de vingt-quatre heures d'étuve à 37°, on dosait l'NH^3 formé. Chaque organe avait un tube témoin pour apprécier le taux de l'alcalinité de la suspension d'organe et le déduire du dosage d'$N.NH^3$ final. De nombreuses expériences (faites sur le rein, les muscles, le cerveau, le foie de chiens injectés de doses correspondant à 80 d'activité diastasique par kilogr. d'animal) nous ont montré que les reins, les muscles ne fixaient pas la diastase, cependant que le cerveau, et surtout le foie, fixaient une légère partie du pouvoir diastasique. Dans six expériences où les doses de diastase injectées étaient comparables, nous avons trouvé qu'un gramme de *foie* était capable de produire à 37° sur une solution d'urée en vingt-quatre heures les doses d'$N.NH^3$ suivantes :

1re expérience. .	0,009 $N.NH^3$	4e expérience.	0,012
2e —	0,010 $N.NH^3$	5e —	0,016
3e —	0,009 $N.NH^3$	6e —	0,016

Dans deux expériences, le *cerveau* nous a donné un résultat positif très léger :

1re expérience.	0,0009 $N.NH^3$
2e —	0,0009 $N.NH^3$

Nous avons ensuite recherché le passage de la diastase dans l'*urine* et dans la *bile*, et nous avons trouvé une activité diastasique complètement nulle.

Nous avons ensuite procédé à des *injections sous-épidermiques massives* et, après la mort, nous avons recherché la diastase dans les organes et le sang. Comme nous le reverrons plus loin, le mécanisme d'intoxication est tout à fait différent et, en particulier, beaucoup plus lent à se développer. Nous citerons, parmi de très nombreuses recherches, deux expériences qui donnent des chiffres que l'on peut considérer comme moyens. Quarante-huit heures après l'injection, cinq à six heures après la mort, on trouve le *sang légèrement actif*. 1 cent. cube de sérum produit 0,001 d'$N.NH^3$ en vingt-quatre heures à l'étuve. Dans une deuxième expérience, 1 cent. cube de sérum produit 0,0012 d'$N.NH^3$. Il n'a pas été possible de déceler le moindre pouvoir diastasique dans les organes, pas plus dans les urines que dans la bile.

Les *administrations de diastase par la bouche* ne nous ont donné *aucun passage de diastase* dans l'organisme, qu'il s'agisse du sang ou des organes.

IV. — Action toxique de l'uréase *in vivo*.

L'action toxique a été particulièrement étudiée par nous en un grand nombre d'expériences que nous résumerons brièvement, renvoyant aux notes que nous avons communiquées à la Société de Biologie (1) et à l'Académie des Sciences (2).

Nous avons produit l'intoxication sous trois formes : 1° l'*intoxication aiguë*; 2° l'*intoxication subaiguë*; 3° l'*intoxication chronique*, en procédant soit à des injections intraveineuses massives, soit à des injections sous-épidermiques massives, soit à des injections intraveineuses ou sous-épidermiques subintrantes.

1° Intoxication aigue. — *Disparition totale d'urée, production d'ammoniaque.* — Lorsque l'on injecte dans la veine d'un animal une macération de farine de soja à 10 p. 100 à doses suffisantes, on obtient avec une rapidité extraordinaire la *transformation totale de l'urée de son organisme en ammoniaque*. L'urée étant extrêmement diffusible, il est certain que, s'il en restait la

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 12 avril 1919.
(2) *C. R. Acad. des Sciences*, 15 juillet 1910.

moindre trace dans l'organisme, la présence de l'urée serait décelable dans le sang. Or, cinq minutes après une injection de 60 cent. cubes de diastase d'activité 12 à un chien de 10 kilogrammes environ, le xanthydrol ne peut précipiter la moindre trace d'urée à l'état de xanthylurée dans le sang prélevé à ce chien. Il est bien entendu que toutes les précautions ont été prises pour éviter que l'action de la diastase injectée ne se continue sur l'urée sanguine, *in vitro*, après la prise. Le sang est recueilli directement dans le réactif iodômercurique au sortir de la veine et l'on connaît l'extrême sensibilité du dosage de l'urée par le xanthydrol et son extrême précision. Cette disparition totale de l'urée se maintient pendant un temps variable selon les quantités de diastase injectées.

Lorsque la dose de diastase indiquée plus haut a été injectée, les phénomènes toxiques s'installent dès le début et l'*animal meurt, en un temps plus ou moins long, d'intoxication ammoniacale*. Parfois l'animal meurt sans que l'urée ait eu le temps de réapparaître dans le sang; d'autres fois, on assiste à un retour manifeste de l'urée dans le milieu sanguin quelque temps avant la mort. Les lésions produites par l'ammoniémie du début semblent définitives et la réapparition de l'urée ne semble pas jouer un rôle favorable quelconque dans la régression des phénomènes toxiques.

De l'ensemble de nos expériences sur l'intoxication aiguë, il semble se dégager deux faits généraux auxquels nous n'avons pas vu d'exception. Le premier est qu'il faut un certain taux minimum d'activité diastasique par kilogramme d'animal pour arriver à l'intoxication aiguë : ce taux est à peu près égal à 60 d'activité diastasique par kilogramme. Si ce taux n'a pas été atteint, l'animal, après quelques phénomènes d'excitation nerveuse, de myoclonisme, se remet et survit sans les moindres séquelles. Le deuxième fait est que l'animal, injecté d'une dose suffisante de diastase, meurt quand, dans son sang, l'N.NH^3 a atteint une concentration d'environ 0 gr. 070 par litre (que nous appellerions le *seuil d'intoxication ammoniacale*). Cette seconde règle est, d'ailleurs, générale et semble s'appliquer à toutes les intoxications, qu'elles soient aiguës, subaiguës ou chroniques. Nous avons toujours trouvé, dans le sang des animaux morts par injection d'uréase (qu'elles aient été mas-

sives ou subintrantes, intraveineuses ou sous-épidermiques), des doses d'N.NH^3 au moins égales à 0,070 par litre.

Cette constatation semblerait bien prouver que *l'animal meurt bien d'ammoniémie et uniquement d'ammoniémie.*

En effet, lorsque l'on injecte des diastases, on ne peut jamais séparer ces dernières de leur support albuminoïde, quelles que soient les purifications que l'on essaie de faire ; aussi craint-on toujours de n'avoir observé que la résultante de plusieurs actions : actions diastasiques pures et action toxique des supports albuminoïdes. Cette dernière a été souvent mise en évidence, et nombreuses sont les diastases dont le pouvoir diastasique pur est inoffensif cependant que l'animal succombe à chaque injection de la diastase accompagnée de son support. Dans le cas de l'uréase, la régularité avec laquelle on voit l'animal atteindre son seuil ammoniémique avant de mourir tend à faire croire que, seules, les propriétés urolytiques entrent en jeu dans le mécanisme de l'intoxication.

Pour ajouter à ces faits de nouvelles preuves, nous avons essayé de détruire la diastase en touchant le moins possible au support de cette dernière. Malheureusement nous nous sommes heurtés à des difficultés très grandes que nous avons décrites dans un des paragraphes précédents. Les antiseptiques, l'addition d'alcalis ou d'acides précipitaient les albumines du liquide avant de neutraliser d'une façon appréciable le pouvoir diastasique. Seule la chaleur nous a donné un bon résultat, car nous avons pu, par ce moyen, détruire complètement le pouvoir diastasique sans produire de précipitation dans le liquide.

Intoxication suraiguë, après surcharge préalable en urée de l'organisme. — Une autre série d'expériences consiste à activer l'action toxique de l'uréase en donnant à celle-ci une plus grande quantité d'urée à transformer en carbonate d'ammoniaque : elle démontre d'une façon nette le mécanisme de l'intoxication.

Nous avons dit que, lorsque l'on n'injecte pas à l'animal la dose de diastase suffisante, celui-ci ne meurt pas, bien que, dans certains cas, les réactifs démontrent la disparition totale ou presque totale de l'urée du sang. Or ces animaux étaient toujours peu chargés en urée et avaient, avant l'expérience, des doses variant de 0,04 à 0,06 d'N uréique dans le sang.

Après transformation intégrale de l'N uréique en $N.NH^3$ par la diastase injectée, ils n'ont toujours que 0,04 à 0,06 d'$N.NH^3$ dans le sang, ce qui n'est pas suffisant pour amener la mort.

Un fait curieux est cependant à remarquer : lorsqu'on introduit dans l'organisme de l'$N.NH^3$ sous forme de sesquicarbonate d'ammoniaque à un taux de 0,04 par kilogramme environ, on constate des contractures et des phénomènes d'intoxication très nets, alors que le sang ne renferme que des quantités d'$N.NH^3$ égales à environ 0,03 par litre de sang. Par injection d'uréase on peut amener ce taux à 0,04 et même 0,06 sans constater le moindre phénomène de contracture ou d'intoxication. L'$N.NH^3$ produit de cette façon paraît plus supportable à l'organisme et, le seuil mortel d'$N.NH^3$ n'ayant pas été atteint, l'animal survit.

Mais *si l'on charge l'animal en urée* par un moyen quelconque (le plus simple est de lui faire des injections d'urée) et que l'on fasse agir des quantités de diastase, même moins fortes que les quantités indiquées comme non mortelles, *on arrive à faire mourir l'animal dans un temps très court.*

Nous avons procédé de deux façons à cette expérience. A un premier chien nous avons d'abord injecté 75 de pouvoir diastasique par kilogramme. Cette dose devait être mortelle en deux heures environ. Le chien avant l'injection avait un sang qui contenait seulement 0,10 d'N uréique. Dès l'injection de diastase, nous poussons dans ses veines une solution concentrée d'urée au 1/5, puis, dix minutes et dix-sept minutes après, nous recommençons une injection d'urée. L'animal meurt au bout de vingt minutes ayant un taux formidable d'ammoniaque dans son sang.

Dans la seconde expérience, nous avions chargé le chien en urée, en lui faisant deux injections sous-cutanées de 10 grammes d'urée faites les jours précédents, et une troisième injection de 10 grammes faite le jour même deux heures avant l'injection de diastase. Au moment de l'injection, l'animal a un sang contenant 0,442 d'N uréique. On lui injecte seulement 30 de pouvoir diastasique par kilogramme (quantité tout à fait insuffisante pour amener la mort). Néanmoins le chien meurt en quinze minutes sans phénomènes de contractures, ne montrant aucun des signes de la première phase de l'intoxication aiguë, pour ne

manifester que les derniers symptômes qui précèdent la mort : apnée et coma. Le sang prélevé cinq minutes après l'injection contenait déjà 0,16 d'$N.NH^3$ par litre. Là encore nous voyons la seule ammoniémie jouer un rôle important, et, selon que par des artifices, nous arrivons à diminuer ou à augmenter le taux d'$N.NH^3$ produit dans le sang, nous diminuons ou augmentons la toxicité de la diastase.

Nous résumons dans les tableaux suivants ces deux expériences qui démontrent nettement que la mort est bien fonction de la rapidité avec laquelle le taux de l'$N.NH^3$ s'élève dans l'organisme.

1re EXPÉRIENCE. — **Injection d'urée de suite après l'injection d'uréase.**

PRÉLÈVEMENT DE SANG	INJECTIONS D'URÉE à 10 0/0	DOSAGES DANS LE SANG	
		N urée p. litre	$N.NH^3$ p. litre
Avant l'injection de l'uréase.	»	0,106	0,005
1 minute après l'injection	1 c. c.	0,02	»
5 minutes —	2 c. c.	0,421	0,100
17 minutes —	3 c. c.	1,59	0,23

2e EXPÉRIENCE. — **Charge du chien en urée avant l'injection.**

PRÉLÈVEMENT DE SANG	DOSAGES DANS LE SANG	
	N urée p. litre	$N.NH^3$ p. litre
Avant l'injection	0,442	0,0056
5 minutes après l'injection	0,354	0,161
15 minutes —	0,274	0,226

Les accidents tiennent-ils à la disparition de l'urée ? — Les deux expériences précédentes sont à double fin : car elles résolvent un autre problème : *L'urée a-t-elle un rôle physiologique ?* La concordance des deux actions, production d'$N.NH^3$ et disparition totale de l'urée, ne marque-t-elle pas le rôle de ce dernier, ou bien le groupement de ces deux phénomènes

ne vient-il pas créer un nouveau genre d'intoxication où l'ammoniémie n'interviendrait pas seule. En un mot, une cellule privée d'urée peut-elle continuer à vivre? Les deux expériences que nous avons relatées répondent directement à cette question. Car, comme les chiens recevaient continuellement de l'urée, à aucun moment de l'expérience l'absence totale de l'urée ne s'est manifestée. Il y a toujours eu un taux d'urée maintenu constant ou à peu près. Néanmoins les animaux sont morts avec la même rapidité et avec le même syndrome d'intoxication. Inversement nous avons eu des animaux à faible taux d'urée sanguine initiale, dont toute l'urée est disparue après l'injection d'uréase et qui n'ont manifesté aucun accident. L'urée ne semble donc pas jouer un rôle indispensable dans l'organisme et son absence ne semble pas être cause de l'intoxication par l'uréase.

Le rôle diastasique ayant été précisé dans le mécanisme de la mort par injection d'uréase, il nous reste à décrire, avec quelques détails, l'intoxication aiguë type sur un animal normal.

Un chien de 8 kilogr. 900 reçoit en cinq minutes dans la veine fémorale 60 cent. cubes d'une macération de soja à 10 p. 100 représentant 100 d'activité diastasique par kilogramme d'animal. Le chien vomit d'ordinaire vers le milieu de l'injection; puis les premières contractions apparaissent vingt minutes après la fin de l'injection qui a duré dix minutes; de grandes crises tétaniformes, avec contraction du diaphragme et opisthotonos, des contractures spasmodiques des membres en extension se produisent de cinq en cinq minutes, cependant que des périodes de coma s'intercalent entre les crises. Une heure trois quarts après l'injection, l'animal meurt ayant une température anale de 43°5, qui persiste une demi-heure après la mort. A l'autopsie on trouve un cœur en systole, un sang noir incoagulé, des organes congestionnés (notamment le cerveau ponctué de petites taches hémorragiques). Le sang analysé avant l'injection contenant 0,059 d'N uréique par litre (méthode de Fosse) et seulement 0 milligr. 7 de $N.NH^3$, une deuxième prise de sang, faite vingt minutes après la fin de l'injection, montre une disparition totale de l'urée du sang; le taux de l'$N.NH^3$ est monté à 0,057 par litre. On retrouve donc intégralement, sous

forme NH^3, tout l'N uréique disparu. Quarante minutes après nous trouvons le même résultat.

Une quatrième prise de sang, faite une heure trois quarts après l'injection, au moment de la mort, donne un taux de $N.NH^3$ égal à 0,0753 par litre, cependant qu'on ne peut déceler la moindre trace d'urée au xanthydrol.

Pour nos dosages, nous prenons toujours la précaution de recueillir directement le sang dans l'éprouvette contenant le réactif iodomercurique, car on sait l'extrême rapidité de l'action de l'uréase ; aussi l'abandon du sang recueilli, pendant quelques minutes, *in vitro* sans que la diastase soit détruite fausserait-il complètement les chiffres. Il en est de même pour les organes que nous avons analysés au point de vue de leur teneur en ammoniaque. Ici, la difficulté est encore plus grande : car, avec quelque rapidité que l'on aille, il faut le temps matériel de prélever l'organe après la mort de l'animal, de découper immédiatement quelques lanières de l'organe, de les hâcher et de les précipiter dans l'alcool méthylique qui arrête toute action diastasique.

On peut prendre comme chiffres normaux de teneur en $N.NH^3$ les chiffres suivants : pour le foie, 0,069 p. 1.000, pour le cerveau 0,058 p. 1.000. Les analyses des organes du chien, mort après l'injection d'uréase, sont très chargées en NH^3 ; on trouve en effet pour le foie 0,161 par kilogramme, et pour le cerveau 0,204 par kilogramme.

Les nombreuses injections intraveineuses que nous avons faites au chien en respectant ces proportions nous ont toujours donné des intoxications du même type, la mort survenant dans des temps très comparables les uns aux autres. Au point de vue chimique, très souvent, nous avons assisté à des réapparitions plus ou moins tardives de l'urée après qu'elle avait complètement disparu du sang.

La disparition totale de l'urée peut se faire très rapidement : cinq minutes et même une minute après la fin d'une injection (qui pouvait durer elle-même quatre ou cinq minutes) on avait parfois une disparition presque totale de l'urée : De 0,10 l'N uréique est tombé à 0,02 en une minute dans une de nos expériences.

Mécanisme de la réapparition de l'urée. — La réapparition de

l'urée semble être fonction d'un mécanisme opposé à celui de l'urolyse et due à un mécanisme de synthèse physiologique (action uropoïétique du foie), qui lutte contre l'NH^3 introduit en fabriquant de l'urée à ses dépens. Ce mécanisme de défense antitoxique est long à se manifester. La diffusion de la diastase, introduite dans le sérum sanguin, se fait lentement dans les autres sérosités du corps humain (tout au moins au début). Le sang reste donc longtemps chargé d'uréase, donc fortement urolytique, ce qui masque l'action réversive du foie. Au bout d'un certain temps seulement, quand le taux diastasique du sang s'est abaissé et ne peut plus détruire l'urée fabriquée par le foie, alors nous voyons l'urée réapparaître, d'abord à l'état de traces, pour retrouver un taux normal dans un temps assez court.

Pour synthétiser toutes ces données, nous allons réunir en tableau trois types d'intoxication aiguë mortelle par l'uréase. Ces trois types se différencient uniquement par la rapidité de réapparition de l'urée dans le milieu sanguin privé momentanément de ce corps par l'action urolytique de la diastase injectée.

	A		B		C	
	N urée	N.NH^3	N urée	N.NH^3	N urée	N.NH^3
Avant l'injection . . .	0,590	0,0007	0,0442	0,011	0,112	0,037
5 min. après l'inject.	»	»	0,0010	»	0,002	»
30 min. —	0,0000	0,0576	0,0000	0,0596	0,000	0,1130
1 heure —	0,0000	0,0540	»	»	0,013	»
1 h. 1/2 —	»	»	»	»	0,015	0,157 *Mort.*
2 heures —	0,0000	0,0753 *Mort.*	0,0000	0,059	»	»
2 h. 1/2 —	»	»	traces indosables	»	»	»
3 heures —	»	»	traces indosables	0,050 *Mort.*	»	»

Comme on le voit d'après ces trois types d'intoxication aiguë, A, B et C, la mort s'est produite plus ou moins rapidement selon le taux d'NH^3 produit, ce taux étant lui-même fonction du taux de départ de la concentration uréique du sang. La réapparition de l'urée dans le sang s'est faite au bout de temps

très inégaux sans influencer le moins du monde l'action toxique de l'uréase.

Charge des organes en ammoniaque. — Nous avons étudié, concurremment, la production d'$N.NH^3$ dans les organes ainsi que la disparition de l'urée. De ce côté, nos études ont été moins poussées que sur le sang : car il y a une très grande difficulté à analyser les organes dès la mort du chien, sans que cette analyse soit entachée d'erreur grossière. En effet, la diastase peut continuer à agir *post mortem*, et en dehors de cette action. Gay Andersen (1) a constaté la rapidité extrême avec laquelle l'urée d'un organe pouvait se transformer en ammoniaque dès la mort de cet organe. Cet auteur en est arrivé à cette conclusion : si l'organe est placé dans des conditions telles que tout mécanisme biochimique de transformation d'urée en NH^3 ne puisse se faire, le taux d'NH^3, comparé à celui de l'urée dans les organes, est identique à celui du sang. L'auteur indique en même temps ces conditions qui consistent à placer les organes dans de l'alcool à — 20° dès la mort de l'animal. Sans avoir réalisé ces conditions, nous avons opéré de façon à arrêter aussi rapidement que possible toutes les actions diastasiques, et pour ce faire, nous prélevions aussi rapidement que possible après la mort un fragment de l'organe à analyser que l'on hachait et que l'on plaçait immédiatement dans une capsule contenant de l'alcool méthylique sulfurique ($5CH^3OH + 0{,}25 SO^4H^2$ 1/10N) pour 4 grammes organe frais. Nous avons pris comme témoins les chiffres que nous avons obtenus en opérant de la sorte sur des organes normaux. Nos chiffres, sans avoir une rigueur absolue, pouvaient se comparer entre eux. Faute d'avoir opéré de la sorte, les auteurs donnent dans les livres classiques des chiffres moyens de teneur en NH^3 beaucoup trop forts.

Nous n'avons étudié l'urée de façon systématique que dans le *foie* après l'injection intraveineuse mortelle d'uréase, le foie est complètement privé de son urée au moment de la mort, c'est-à-dire environ deux heures après l'injection. Nous avons obtenu trois fois ce résultat dans trois expériences différentes. L'organisme est aussi très surchargé en ammoniaque, et on verra, dans le tableau suivant, que les teneurs en $N.NH^3$ sont

(1) *Biol. ch. Journ.*, **34**, p. 269.

parfois triplées. Nous ne donnons évidemment pas d'une façon exacte la teneur des tissus en $N.NH^3$: car, quoique l'animal soit saigné à blanc au moment de la mort, les glandes vasculaires, comme le foie, le rein, retiennent toujours une certaine quantité de sang qui vient fausser les dosages. Nos chiffres expriment donc l'ensemble de l'NH^3 et de l'urée contenus dans les tissus et dans le sang restant qui imprègne les tissus. Dans le tableau suivant nous avons groupé les chiffres normaux trouvés par nous et les chiffres d'$N.NH^3$ trouvés dans les organes après injection d'uréase au cours de trois expériences.

	$N.NH^3$ p. 1.000 normal	APRÈS INJECTION		
		Expér. A	Expér. B	Expér. C
Cerveau	0,058	0,126	0,130	0,097
Foie	0,069	0,255	0,340	0,342
Muscle	»	0,098	»	0,143
Poumon	»	0,199	0,290	»
Rein	0,042	»	»	0,380

L'intoxication ammoniacale produite par l'uréase est comparable à l'intoxication produite par l'injection intraveineuse de sels ammoniacaux à acide faible. — Comme il est facile de le voir dans les tableaux précédents, les augmentations sont très nettes. L'ammoniémie est accompagnée de fixation d'NH^3 dans les tissus. Si nous prenons le taux moyen d'$N.NH^3$ normal en prenant les quantités d'$N.NH^3$ trouvées dans le sang normal et les tissus normaux, nous arrivons au chiffre de 0,042 par kilogramme d'animal. Si nous faisons le même calcul après l'injection d'uréase, nous trouvons 0,16. Il y a donc une augmentation de 0,118 d'$N.NH^3$ par kilogramme. Si nous ne considérons que l'augmentation d'$N.NH^3$ dans le sang, nous le trouvons variable entre 0,07 et 0,250 selon la charge d'urée de l'animal avant l'injection. Tous ces chiffres sont égaux ou supérieurs aux doses mortelles d'$N.NH^3$ indiquées dans les livres classiques (1). En effet, sous forme de sesquicarbonate, l'injection de 0,07 d'$N.NH^3$ par kilogramme d'animal suffit à

(1) Dictionnaire Richet, article Ammoniaque.

déterminer la mort. Nous avons donc réalisé, par injection d'uréase, une intoxication ammoniacale comparable à celle produite par l'injection de sels ammoniacaux.

Nous avons répété de nombreuses fois des expériences d'intoxication ammoniacale par voie intraveineuse, en nous servant du sesquicarbonate d'ammoniaque. Ce sel ammoniacal se trouve facilement dans le commerce et se rapproche du carbonate d'ammoniaque qui est la résultante de l'action de l'uréase sur l'urée. Dans des travaux inédits que nous publierons plus tard, nous avons étudié en détail le mécanisme de ces intoxications, ainsi que le mécanisme de réaction de l'animal contre l'envahissement par les sels ammoniacaux. Nos seuils de toxicité ont été toujours dans les limites indiquées par les livres classiques, correspondant aux limites trouvées dans nos expériences avec l'uréase. Néanmoins, pour comparer d'une façon raisonnable ces chiffres, il faut faire une réserve. Quand on donne 0,07 d'$N.NH^3$ comme limite de toxicité par kilogramme d'animal, on fait entrer dans ce calcul tout le corps de l'animal comme si les différents tissus jouaient un rôle égal. Or, il serait plus conforme à la vérité de ne considérer dans ces calculs que le milieu liquide comme poids intéressant. Il est égal à environ 64 p. 100 du poids total. Si la dose toxique est 0,07 d'$N.NH^3$ par kilogramme d'animal, cela fait, en réalité, 0,11 par kilogramme en ne faisant intervenir que le milieu liquide. C'est à ce chiffre qu'il faut comparer nos résultats : car notre taux ammoniacal est calculé d'après des dosages faits dans le sang et des organes très vascularisés comprenant 90 p. 100 d'eau. Nous les trouvons, d'ailleurs, très près l'un de l'autre : 0,118 pour l'uréase, 0,110 pour l'injection de sesquicarbonate.

2° Intoxication subaigue. — Nous sommes arrivés à réaliser un type d'intoxication subaiguë par l'action de l'uréase en injection sous-épidermique. Sa diffusion dans l'organisme est beaucoup plus lente et l'ammoniémie progresse beaucoup plus lentement. Comme dans les cas d'intoxication aiguë, nous avons constaté qu'il fallait injecter un minimum de pouvoir diastasique par kilogramme d'animal pour produire dans son organisme un taux ammoniacal suffisant à déterminer la mort.

Ce minimum est sensiblement égal à celui qu'il faut injecter

pour produire l'intoxication aiguë. Des chiens de 10 kilogrammes recevant environ 70 de pouvoir diastasique par kilogramme, meurent régulièrement en trente-six et quarante-huit heures. Au moment de la mort on trouve dans le sang un taux d'$N.NH^3$ de 0,07 pour 100 correspondant au seuil de toxicité, et les organes sont chargés en ammoniaque dans des proportions comparables à celles que nous trouvons après les injections intraveineuses.

Toutes ces intoxications ont le même type physiologique, qui se résume ainsi : L'animal injecté perd rapidement sa vivacité et demeure taciturne pendant vingt-quatre heures environ. Il ne mange presque plus, puis brusquement, vers la trentième heure, il se couche dans sa cage, et tombe dans un état comateux qui s'aggrave rapidement. A aucun moment, on ne saisit chez lui la moindre contracture. Vers la quarante-cinquième heure, il meurt sans bouger, en état d'anurie et de coma complets.

La diffusion de la diastase dans l'organisme est plus lente; mais l'effet global est identique : car, *au moment de la mort, le taux ammoniémique est atteint.*

Nous avons recherché la rapidité de diffusion de la diastas dans l'organisme et nous ne sommes arrivés à déceler un pouvoir urolytique dans le sang qu'au moment même de la mort. Le taux ammoniacal du sang s'éleva bien avant que ce pouvoir urolytique apparût dans le sang. Il est, d'ailleurs, facile d'expliquer ce phénomène. Au niveau de l'injection, la diastase fabrique de l'ammoniaque aux dépens de l'urée qui se trouve dans les tissus en contact; cet ammoniaque, emporté par le courant sanguin, est sans cesse remplacé par un apport nouveau d'urée qui subit la transformation ammoniacale à ce niveau. La diastase, ne diffusant que très lentement à travers les vaisseaux, ne passe pas encore dans le sang, alors que l'échange de corps aussi diffusibles que l'urée et l'NH^3 se fait très facilement.

Dans deux expériences, suivies avec grande attention, nous ne sommes arrivés à déceler qu'un pouvoir diastasique très faible, égal à environ 3 au deuxième jour (c'est-à-dire que 1 cent. cube de sérum sanguin a produit, en vingt-quatre heures à 37°, sur 5 cent. cubes d'urée à 1 p. 100, 0 gr. 003 d'$N.NH^3$). Comme la diastase n'inonde pas l'organisme ainsi que dans le procédé des injections intraveineuses, l'action uropoïétique du foie peut se manifester et l'on assiste, après l'injection d'uréase,

à une augmentation d'urée dans le sang. Nous ne pouvons, d'ailleurs, donner une explication chimique à cette augmentation : car, en définitive, la dose de N total de l'organisme ne se modifie pas. Et nous n'assistons qu'à une transformation de l'urée en NH^3 par la diastase, puis à une transformation de l'NH^3 en urée par le foie.

Cependant, dans l'intoxication subaiguë comme dans l'intoxication aiguë, nous assistons à un *blocage du rein*, qui peut expliquer cette surcharge de l'organisme en urée. Dans une expérience. nous voyons le taux moyen d'élimination d'eau, qui était de 731 cent. cubes par vingt-quatre heures, tomber à 245 cent. cubes après l'injection d'uréase. Les quantités d'N uréique et d'N ammoniacal qui étaient respectivement de 0,236 et de 3 gr. 70 par vingt-quatre heures, deviennent après l'injection 0,177 pour l'N.NH^3 et 2.85 pour l'N uréique. Le rapport $\frac{N.NH^3}{N\ \text{urée}}$, qui était de 0,062 avant l'injection, est exactement de 0,062 pendant les deux jours qui suivent l'injection. Dans une seconde expérience où nous avions suivi l'élimination de l'NH^3 et de l'urée, le rapport augmente dans de très faibles proportions. Il était de 0,13 avant, et, après, il est de 0,15. Malgré cette surcharge du sang en N.NH^3, nous ne voyons pas la composition urinaire changer de façon appréciable et les quantités d'N.NH^3 éliminées, par rapport aux quantités d'N. uréique, restent les mêmes. On pourra suivre dans le tableau ci-dessous la marche de l'intoxication chez un chien de 10 kilogrammes ayant reçu 67 de pouvoir diastasique par kilogramme.

	SANG N urée p. 1.000	SANG N.NH^3 p. 1.000
Avant l'injection	0,088	0,0005
2 heures après l'injection	0,121	0,00013
24 heures —	0,084	0,00047
42 h. après l'injection au moment de la mort.	0,255	0,074

Les dosages de N.NH^3 faits dans les organes nous montrent, comme dans les cas d'intoxication aiguë, une augmentation d'N.NH^3 dans les tissus. Toujours, contrairement à ce qui se passe dans l'intoxication aiguë, on retrouve dans les organes

comme dans le sang un taux d'urée légèrement augmenté. Nous avons réuni dans un tableau les quelques chiffres que nous avait donnés l'expérience :

	A		B	
	N.NH³ p. 1.000	N urée	N.NH³ p. 1.000	N urée
Foie	0,312	0,219	0,150	0,215
Cerveau	»	»	0,126	»
Muscles	0,105	»	0,084	»
Poumon	»	»	0,129	»

Si nous procédons au même calcul que pour l'intoxication aiguë, nous trouvons qu'ici l'organisme est encore un peu plus chargé en $N.NH^3$. Celui-ci atteint 0,17 par kilogramme.

3° Intoxication chronique. — Nous avons cherché à réaliser l'intoxication chronique par injections sous-épidermiques et par injections intraveineuses. Les phénomènes d'intoxication sont, d'ailleurs, tout à fait différents et ne ressemblent nullement à des phénomènes d'intoxication subaiguë ralentie. L'action reversive du foie n'est diminuée à aucun moment et jamais l'on n'assiste à une forte baisse du taux uréique dans le sang. On a une élimination très forte d'NH^3 par l'urine. L'animal résiste fort bien à l'administration quotidienne des petites doses d'uréase, et, comme nous le verrons dans une des expériences que nous allons détailler, il faut arriver à l'injection d'assez fortes doses, égales à près de la moitié de la dose mortelle, pour arriver à des manifestations nettes d'intoxication.

a) *Injections sous-épidermiques*. — Nous citerons d'abord les expériences où nous avons injecté de très petites doses d'uréase sous l'épiderme. Au cours d'une première expérience, nous nous sommes préoccupés uniquement de suivre l'élimination de l'N. sous sa forme uréique et sous sa forme ammoniacale. Tout le protocole d'expérience est réuni en un tableau où sont inscrits les quantités de diastase injectées, et l'émission journalière d'urine et de N. sous ses différentes formes. Ce n'est qu'après

la sixième injection que commence à se faire sentir la rétention d'urine et qu'apparaissent les hématuries; par contre l'émission de l'urée par vingt-quatre heures baisse sensiblement à la sixième injection, cependant que le taux de l'NH^3 baisse aussi, il est vrai, mais d'une moins grande quantité. Cette constatation nous a amenés à considérer le rapport du taux de l'N de l'urée au taux de l'$N.NH^3$ pour juger d'une façon précise et nette le changement amené par l'injection d'uréase dans l'élimination de ces deux corps. Bien plus que les chiffres absolus d'N de l'urée et d'N de l'$N.NH^3$, ce rapport montre, par son abaissement au moment des injections de diastase, le surplus d'$N.NH^3$ produit par rapport à l'urée. La fin des injections permet, d'ailleurs, à ce rapport de revenir à une moyenne normale, correspondante à ce qu'il était avant le traitement par l'uréase :

DATES	DIASTASE injectée	URINE			RAPPORT $\frac{N \text{ urée}}{N.NH^3}$	MOYENNES
		Emission	N urée 24 h.	$N.NH^3$ 24 h.		
12	»	1.300	5,20	0,20	26,01	26
13	2 c. c.					
14	2 —					
15	4 —	1.375	6,77	0,37	18,3	
16	»	»	»	»	»	
17	4 c. c.	1.590	5,89	0,34	17,0	
18	4 —	1.425	5,20	0,20	17,5	17,6
19	8 —	1.335	3,9	0,20	Sang { 15,8	
20	8 —	455	2,7	0,15	17,8	
21	»	455	2,7	0,15	17,8	
22	»	1.390	3,1	0,15	26,7	
23	»	1.210	5,4	0,19	27,2	
24	»	1.680	5,15	0,25	20,3	
25	»	1.085	4,76	0,30	15,3	20
30	»	1.325	5,25	0,24	25,0	
2	»	1.880	5,88	0,30	19,28	

L'animal a continué à bien se porter pendant l'expérience : la seule manifestation toxique a été une hématurie après la cinquième injection, hématurie qui n'a d'ailleurs duré que deux jours et a cédé dès que la diastase fut supprimée.

Dans notre deuxième expérience nous avons utilisé des doses plus fortes mais plus espacées, et cette fois nous avons suivi le

métabolisme de l'N non seulement dans son urine, mais aussi dans son sang. L'examen de ce second tableau permet, cette fois, de mieux suivre l'action diastasique. L'émission n'est diminuée que lorsque l'on arrive aux doses de 15 cent. cubes et encore à la troisième injection. Néanmoins ces doses sont bien supportées : car on voit l'émission se relever le second jour après l'injection. Il faut arriver à l'injection de 40 cent. cubes pour voir se manifester une intoxication nette, avec baisse progressive de l'émission et, finalement, mort du chien en une dizaine de

DATES	URINE			RAPPORT	SANG		
	Emission	N urée 24 h.	$N.NH^3$ 24 h.	$\frac{\text{N urée}}{N.NH^3}$	N total p. 1.000	N urée p. 1.000	$N.NH^3$ p. 1.000
15	790	5,55	0,263	21	0,135	0,088	0,0001
16	900	6,10	0,277	22			
	Injection 10 c.c. diastase.						
17	1.090	6,23	0,335	18	0,097	0,04	0,0004
	Injection 10 c.c. diastase.						
18	960	4,72	0,45	10	0,125	0,074	0,0001
19	590	3,00	0,26	11			
	Injection 15 c.c. diastase.						
20	320	4,36	0,31	14 albumine			
21	405	1,56	0,15	10	0,139	0,116	0,0001
22	405	1,56	0,15	10			
	Injection 15 c.c. diastase.				0,139	0,111	0,00003
23							
24	760	5,43	0,46	11	0,111	0,074	0,00002
25	940	5,9	0,27	21			
	Injection 15 c.c. diastase.						
26	340	1,98	0,19	10			
27	950	4,17	0,33	12	»	»	0,0001
28	480	4,39	0,23	19			
29	480	4,30	0,23	19			
	Injection 40 c.c. diastase.						
30	390	5,7	0,42	13			
31	170	4,4	0,34	12			
1	280	4,32	0,26	16	0,131	0,123	0,004
2	225	4,8	0,30	16			

jours. Malheureusement le sang de cet animal n'a pu être analysé le dernier jour. Les variations d'élimination de l'N de l'urée par l'urine sont légèrement déconcertantes et contradictoires.

L'NH^3 a une élimination plus compréhensible : régulièrement, vingt-quatre heures après l'injection, on voit le taux ammoniacal augmenter dans l'urine ; cette élévation est de courte durée. C'est encore dans ce cas le rapport $\frac{\text{N. urée}}{\text{N.NH}^3}$ qui exprime de la façon la plus limpide les phénomènes chimiques qui se passent; on le voit régulièrement s'abaisser après chaque injection pour se relever très rapidement quelquefois. L'N total du sang reste fixé de façon remarquable, cependant que l'N de l'urée du sang, qui a faibli de façon nette après la première injection, semble se maintenir à son taux normal de façon générale.

Il est à remarquer, néanmoins, que les résultats sont bien différents selon le moment où l'analyse est faite après l'injection. On voit, en effet, que, lorsque l'on agit avec des doses de diastase subintrantes et sous l'épiderme, on note toujours une diminution de l'urée lorsque l'on analyse le sang environ vingt-quatre heures après l'injection. Si l'on analyse, comme nous l'avons fait le 22 avril, le sang tout de suite après l'injection sous-épidermique, il n'y a pas d'action sur l'urée. Si, par contre, on attend quarante-huit heures, le sang a déjà repris un taux d'urée normal et quelquefois même supérieur à la normale. Nous n'arrivons pas, malgré 5 injections qui font en tout 65 cent. cubes de diastase, à faire apparaître l'NH^3 de façon nette dans le sang : il faut atteindre 40 cent. cubes de diastase en une seule injection pour avoir 0.004 d'$N.NH^3$ par litre de sang au bout de 48 heures. Cette dernière dose de diastase déclencha la mort, très lente à se produire d'ailleurs.

En résumé, le chien supporte bien les petites doses d'uréase en injection sous-épidermique et, à moins d'atteindre de fortes doses, il ne paraît pas possible de produire une élévation importante du taux ammoniémique.

b) *Injections intraveineuses.* — Pour cette partie, la question fut beaucoup moins poussée. Néanmoins nous avons injecté journellement à un chien des doses croissantes d'uréase : d'abord 5 cent. cubes, puis 10 cent. cubes, puis 17 cent. cubes ; puis nous avons attendu deux jours et avons réinjecté 15 cent. cubes. Le chien les supporta bien et grossit rapidement sans donner le moindre signe d'inquiétude. L'élimination urinaire

nous a donné un rapport $\frac{N.\ urée}{N.NH^3}$ très faible, égal à 10. Nous attendons dix jours et le rapport est sensiblement remonté, cependant que l'on ne peut déceler la mointre trace d'NH^3 dans son sang. Il s'est produit certainement, après chaque injection de diastase, une certaine quantité d'NH^3 qui n'a nullement inquiété le chien. Ces petites quantités d'NH^3 ont été immédiatement retransformées en urée par le foie et, lorsque l'on attend seulement 24 heures pour rechercher l'NH^3 dans le sang, on ne retrouve plus que les traces normales. Ces doses subintrantes sont donc aussi bien supportées, si ce n'est mieux, qu'en injection sous-épidermique. Ceci permet d'envisager peut-être un jour le traitement de certains états pathologiques, étant donnée l'extrême facilité avec laquelle l'organisme peut résister aux injections faites à petites doses.

Pour compléter le chapitre des intoxications, nous avons voulu essayer deux autres modes d'introduction de la diastase dans l'organisme. Le premier était de l'introduire *per os*, le deuxième de faire pénétrer après trépanation quelques centimètres cubes de diastase stérile dans le cerveau.

Ces deux expériences ne nous ont donné que des résultats négatifs, ou, tout au moins pour ce qui est de l'injection intracranienne, très difficiles à interpréter.

4° Intoxication *per os*. — On prend un chien de 6 kilogr. 500 : on le met en cage et en équilibre urinaire autant que faire se peut. On analyse son sang ; puis on lui administre avec une sonde 100 cent. cubes de macération deux jours de suite ; son urine est suivie et son sang analysé une deuxième fois ; on administre une seconde fois pendant deux jours 100 cent. cubes de macération et on analyse à nouveau urine et sang, quarante-huit heures après la seconde prise. Comme les résultats furent absolument négatifs, nous ne donnerons pas tous les détails de cette expérience : nous nous contenterons de la résumer. Dans le sang, l'N uréique a varié de 0,12 à 0,139 pendant toute la durée de l'expérience, tendant plutôt à augmenter ; l'$N.NH^3$ n'a pas augmenté. Quant à l'élimination urinaire, elle n'a varié que dans des limites physiologiques, l'urée augmentant ou diminuant de moins de 1 gramme pendant

les vingt-quatre heures, l'N.NH^3 ne se modifiant pas pour ainsi dire. La diurèse n'est pas influencée. La diastase n'est décelée ni dans le sang ni dans l'urine.

5° Intoxication intracérébrale. — Nous avons pensé pouvoir reproduire tous les phénomènes d'intoxication produits par l'injection intraveineuse d'uréase en injectant directement la diastase dans le cerveau après trépanation. Les phénomènes de contracture de tétanisation constatés proviennent à coup sûr de la fixation de l'NH^3 sur la cellule nerveuse et l'introduction de la diastase au niveau même des tissus qui paraissent le plus sensibles à l'NH^3 semblait devoir agir plus énergiquement, par conséquent plus rapidement sur l'élément nerveux ; mais, si petite que soit la quantité de liquide injecté dans un des hémisphères ou à l'intérieur d'un ventricule cérébral, il y a toujours une action traumatisante qui masque les autres phénomènes, et l'on ne sait s'il faut attribuer les contractures et les paralysies que manifeste le chien injecté à la distension du tissu cérébral, ou à l'action toxique de l'NH^3 produit par la diastase. Nous avons procédé à trois expériences calquées les unes sur les autres.

On injecte 3 c.c. 5 de diastase d'activité 9 à 12 dans l'encéphale au niveau de la ligne médiane. Cette diastase est stérilisée ; on reprend, en effet, par de l'eau stérilisée le précipité obtenu par l'action de l'alcool sur la macération. On centrifuge pour avoir un liquide clair que l'on injecte. En général dès la fin de l'injection l'animal se contracte, puis est atteint de parésie du train arrière ou des pattes de devant. D'ordinaire la paralysie est exagérée pour les membres se trouvant du côté opposé où a été fait l'injection. Dans un cas nous avons noté de l'emprostothonos, de la défécation et de la polypnée. L'animal incapable de se tenir sur ses pattes meurt ordinairement en quarante-huit heures. A l'autopsie, on trouve une substance nerveuse lésée au niveau de l'injection, avec taches hémorragiques.

Le cerveau, au niveau de l'injection, contient encore après quarante-huit heures de la diastase active. Les parties lésées analysées contiennent moins de N.NH^3 que d'autres parties saines du cerveau où la diastase n'a pu diffuser : les différences ne sont pas néanmoins très grandes.

	A	B
	$N.NH^3$	$N.NH^3$
Cerveau parties saines.	0,058	0,029
— parties lésées.	0,096	0,047

Histologiquement, les lésions des cellules nerveuses sont très nettes et nous permettent de dire que nous avons réalisé localement au niveau des centres nerveux les phénomènes d'intoxication qui se produisent quand on introduit la diastase dans la circulation générale et que l'ammoniaque se fixe secondairement sur ces centres.

V. — Action réversive du foie.

Nous avons parlé dans un des chapitres précédents de l'action réversive du foie, qui n'est que la mise en œuvre de sa fonction uropoïétique. L'expérience où elle se manifeste avec le plus de limpidité est celle où l'on voit l'urée réapparaître dans le sang, au bout de une heure et demie à deux heures après la disparition totale de cette urée. Il ne semble pas douteux que cette action soit là une véritable action de défense, qui tend vraisemblablement à retransformer l'ammoniaque produit, ce qui retarderait ou éviterait les accidents. Nous avons voulu mettre en lumière cette action du foie et, pour cela, nous avons d'abord cherché à le supprimer en tant qu'organe fonctionnel en nuisant le moins possible au restant de l'organisme. Nous avons choisi deux procédés : le premier consistait à détruire le foie par ingestion ou injection de $CHCl^3$; le second consistait à faire une ligature temporaire de la veine porte au moment de l'injection d'uréase. Ces expériences nous ont donné des résultats qui, sans être tout à fait concluants, nous permettent de mettre en lumière la fonction uropoiétique du foie.

1° Le chloroforme est administré, mélangé d'huile d'olive, par la voie buccale. Un chien de 10 kilogrammes environ reçoit d'abord 13 cent. cubes de $CHCl^3$ mélangé à 40 gr. d'huile, le lendemain 13 cent. cubes et le sur lendemain 13 cent. cubes encore. Ce dernier jour, la moitié des 13 cent. cubes de chloroforme

mélangés à l'huile sont injectés dans le rectum. Dès le deuxième jour l'animal fait de la cholurie et de l'albuminurie qui augmentent le troisième jour. Nous avons donc, par ce procédé, touché, en même temps, le rein et le foie; ce qui gênera dans l'interprétation des phénomènes. On injecte sous l'épiderme de ce chien une diastase dont le pouvoir est de 80 par kilogramme d'animal. Le chien, au bout de vingt-quatre heures, est déjà dans le coma et succombe au bout de trente-deux heures. Dans cette expérience les temps d'intoxication paraissent fortement réduits, la rapidité avec laquelle s'installe le coma est surtout remarquable. Car dans les expériences à injection hypodermique, où l'on n'a pas procédé à un essai de destruction du foie, l'animal ne tombe dans le coma que vers la trente-sixième ou quarantième heure pour mourir en quarante-huit heures seulement.

Nous avions espéré que, le foie étant plus ou moins détruit, l'animal fabriquerait de l'NH^3 avec son urée grâce à l'uréase, sans pouvoir retransformer son NH^3 en urée, grâce à ses ferments uropoïétiques.

Malheureusement ce que nous avions pensé ne s'est pas réalisé, bien que cependant le foie ait été très atteint, comme l'ont démontré les nombreux examens de coupes. Le protoplasma des cellules hépatiques était, en effet, très vacuolaire et ne prenait plus (ou très mal) les colorants, certaines cellules étaient même complètement vidées de leur contenu; la diffusion du $CHCl^3$ se faisant principalement autour de la veine sus-hépatique et non autour de l'espace porte comme on aurait pu s'y attendre.

Malgré ces grosses altérations, le taux de l'urée s'est maintenu et est même remonté comme chez les animaux à foie sain injectés de cette façon : La remontée est cependant moins forte que lorsque le foie est sain. Une seule chose semblerait montrer la déficience de l'action hépatique : nous trouvons, en effet, au dosage dans le sang et dans les organes, des taux d'$N.NH^3$ sensiblement plus forts que ceux trouvés dans des expériences du même genre sans destruction du foie, expériences dans lesquelles la charge en urée du sang du chien est de même force. En effet le taux ammoniacal du sang monte plus vite et atteint 0,010 pour un litre au lieu de 0,075 et les

quantités d'N.NH³ des organes sont notablement plus élevées.

Nous réunissons ces données dans un tableau comparatif qui permet de mieux saisir les différences d'action dans les

	EXPÉRIENCE TÉMOIN Injection diastase sous-épidermique (7°)		EXPÉRIENCE AVEC DESTRUCTION DU FOIE par injection s.-épiderm. (7g)	
	N urée p. 1.000	N.NH³ p. 1.000	N urée p. 1.000	N.NH³ p. 1.000
Avant l'injection : sang.	0,098	0,00005	0,096	0,001
Après l'inj. : sang { 24 h.	»	0,0047	»	0,020
Après l'inj. : sang { 36 h.	0,25	0,0750	0,209	0,098
— foie. . . .	»	0,150	»	0,312
— muscle . .	»	0,084	»	0,105

deux cas. Peut-être, dans cette augmentation d'N.NH³, peut-on voir une mise en évidence de la déficience de la fonction hépatique ?

2° Dans une seconde expérience, nous avons voulu détruire le foie plus complètement et plus électivement. Nous avons, pour cela, injecté dans le canal cholédoque un mélange de chloroforme et de paraffine qui, pensions-nous, devait se prendre dans la glande hépatique et localiser autant que faire se peut l'action du chloroforme sur cette glande. On injecta 10 cent. cubes d'une mixture à parties égales (paraffine-chloroforme) dans le cholédoque d'un chien. On referme après cette injection et on attend au lendemain.

Le lendemain l'urine contient des traces d'albumine et des pigments biliaires. Nous avons donc encore touché le rein, mais d'après le dosage de l'albumine, il semble être beaucoup moins touché que la dernière fois. Nous faisons cette fois une injection intraveineuse de diastase, mais seulement à 42 de pouvoir diastasique par kilogramme. Cette quantité, injectée à un chien ayant une teneur en urée normale de 0,06 à 0,10 d'N uréique, ne serait pas mortelle, ou tout au moins ne le serait qu'à longue échéance. Malheureusement l'opération de la veille et l'action du chloroforme avaient réagi violemment sur l'organisme. Et notre sang de départ est un peu plus chargé en urée (0,270 N urée). La rapidité avec laquelle le chien est mort peut donc être, en partie, imputable à la grande quantité d'urée

du sang au départ, en même temps qu'à l'absence d'action du foie supprimé par l'injection de $CHCl^3$. (Le foie présenté a, histologiquement, les mêmes altérations alvéolaires considérables dans le protoplasma de ses cellules. Nous avons retrouvé la même diffusion du chloroforme autour de la veine sus-hépatique, bien que l'injection de paraffine-chloroforme ait été poussée dans le cholédoque.)

Le chien meurt en dix minutes sans contractures, ayant un taux d'$N.NH^3$ de 0,214 p. 1.000 dans le sang; le muscle et le foie contenant respectivement 0,143 et 0,342 d'$N.NH^3$ par kilogramme. Ces chiffres sont comparables à ce que l'on trouve dans les cas d'injections intraveineuses, mais avec une dose de diastase plus grande (70 par kilogramme) et surtout dans un temps beaucoup moins court. Là encore, l'altération du foie semble avoir joué un rôle important dans le mécanisme de l'intoxication. L'action réversive du foie ne jouant pas, l'animal a pu atteindre un taux ammoniacal sanguin élevé en très peu de temps.

3° Le chloroforme ayant toujours lésé le rein et le foie en même temps et ayant, de ce fait, enlevé une valeur de spécificité à nos expériences qui ne tendaient qu'à supprimer l'action hépatique, nous avons tenté de suspendre l'action hépatique seule, d'une façon temporaire, pendant l'injection et pendant dix minutes après cette injection. Nous avons pris un chien de 12 kilogr. 5 auquel nous avons fait, d'abord, une prise de sang; puis nous lui avons lié temporairement la veine porte en passant simplement un fil sous cette veine. Nous tendions le fil au moment où nous faisions l'injection et continuions à interrompre toute circulation porte pendant dix minutes après l'injection. A ce moment et avant de relâcher la ligature, nous avons fait une seconde prise de sang. Deux autres prises ont été faites encore après le relâchement de la ligature. La circulation porte est donc restée interrompue pendant vingt minutes : la masse intestinale s'est congestionnée et est devenue complètement noire, mais le chien supporte, sans autre symptôme, cet arrêt partiel de circulation. Nous injectons dans les veines de ce chien environ 30 unités de pouvoir diastasique par kilogramme. (Au départ, il avait un taux d'N. uréique de 0,086 p. 1.000.) Nous comparons les résultats trouvés dans cette expérience

avec ceux obtenus dans une expérience précédente comparable à presque tous les points de vue. (Nous avions injecté en effet 30 unités de pouvoir diastasique par kilogramme à un chien dont le taux de départ en N. uréique était de 0,107 p. 1.000.) Nous réunissons dans le tableau suivant les résultats trouvés :

	EXPÉRIENCE AVEC LIGATURE		EXPÉRIENCE TÉMOIN	
	N urée	$N.NH^3$	N urée	$N.NH^3$
Sang avant	0,086	0,0056	0,107	0,0008
— 10 minutes après ligature.	0,039	0,063	0,069	0,037
— 15 minutes après ligature enlevée	0,074	0,04	»	»
— 5 h. après.	0,112	0,016	0,083	0,014

En consultant ce tableau, nous voyons que, nous plaçant dans des conditions aussi semblables que possible, nous avons, dans le cas où nous avons interrompu la circulation du foie pendant l'injection, une diminution d'N. urée plus grande (0,047) que lorsque nous ne mettons pas de ligature (0,038). Nous avons de plus, dans le cas de la ligature, une plus grande production d'$N.NH^3$ (0,057) au lieu de 0,036).

Dès que nous enlevons la ligature les choses tendent à se rapprocher dans les deux expériences et nous nous retrouvons à la fin de l'expérience, c'est-à-dire une heure après l'injection, avec un taux sensiblement égal d'$N.NH^3$ dans les deux sangs. Les doses de diastase injectées n'étant intentionnellement pas suffisantes pour occasionner la mort, nous avons pu suivre avec tranquillité les différentes phases de l'apparition et de la disparition de l'$N.NH^3$ dans le sang. La surproduction d'$N.NH^3$ et la disparition plus grande de l'urée correspondent bien à la suspension de l'action hépatique. Quand celle-ci rentre en jeu, l'équilibre se rétablit. Il est regrettable que nous n'ayons pas pu suspendre plus longtemps la circulation porte pour rendre encore plus sensible la différence qui s'est esquissée cependant d'une façon nette : mais les phénomènes de congestion portale extrême et d'anémie périphérique correspondants sont tels que l'expérience n'aurait plus aucune valeur si elle était prolongée;

aussi n'avons-nous pas poussé au delà de vingt minutes la ligature de la veine porte.

Nous reprendrons, d'ailleurs, cette question avec des chiens à fistule d'Eck complète, et nous espérons, avec cette technique, démontrer d'une façon plus nette le rôle antagoniste joué par le foie dans les intoxications ammoniacales produites par l'uréase.

VI. — Anticorps et sensibilisatrice.

Au cours de nos recherches sur les intoxications chroniques, nous avons injecté de petites doses de diastases à des chiens et nous avons, de ce fait, employé le système classique pour essayer de créer des anticorps diastasiques dans le sang des animaux. La facilité des dosages, permettant d'apprécier numériquement les actions diastasiques, et donnant de ce fait à ces expériences une précision intéressante au point de vue de la biologie générale, nous pensions suivre concurremment le sang de ces animaux et au point de vue de l'NH^3, et au point de vue des pouvoirs antidiastasiques et diastasiques. Nous espérions que cette diastase, robuste, facile à retrouver dans l'organisme, nous donnerait au point de vue antidiastasique de meilleurs effets que les innombrables diastases qui ont été essayées jusqu'à ce jour. Nous devons avouer que, malgré des préparations très longues d'animaux, nous ne sommes arrivés à aucun résultat.

Nous avons essayé la voie intraveineuse et la voie sous-épidermique.

a) Voie sous-épidermique. — Notre première expérience consista en injections de très petites quantités de diastase, ces injections étant faites tous les jours. Nous avons poursuivi nos injections pendant huit jours, en commençant par 2 cent. cubes, pour donner 4 cent. cubes, puis 8 cent. cubes à la fin de la série. A ce moment se manifestaient déjà des actions urolytiques de la diastase, voire même des actions toxiques : car, après la huitième injection, des hématuries légères étaient apparues. C'est ce qui nous fit, d'ailleurs, cesser la série d'injections. Le sérum du chien fut alors examiné à deux points de vue.

D'abord au point de vue *urolytique*, nous nous aperçûmes que les injections sous-épidermiques n'avaient nullement communiqué de propriétés diastasiques au sang. En effet 1 cent. cube de sérum, mis en contact avec de l'urée pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, ne formait aucune trace d'ammoniaque. Cependant les produits d'hydratation de l'urée fabriqués par la diastase au niveau du point d'injection par simple diffusion de l'urée et de l'ammoniaque, avaient passé dans l'économie et avaient même provoqué un commencement d'intoxication. Ce peu de diffusion de la diastase dans le milieu sanguin explique d'ailleurs le manque total de réaction de l'organisme vis-à-vis de la diastase ; il faut en effet, pour qu'une antidiastase se produise, que la diastase soit mêlée intimement au milieu sanguin.

Le manque total d'*antidiastase* vint confirmer cette hypothèse. Pour rechercher l'antidiastase, nous avons mis en contact, dans une série de tubes, 0 c. c. 1 de diastase active avec des doses croissantes de sérum de 0 c. c. 1 à 1 cent. cube de sérum. Puis nous avons laissé en contact pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37° et nous avons ensuite essayé l'activité du mélange comparativement avec 0 c. c. 1 de diastase pure abandonnée vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. *L'action diastasique était renforcée par la présence du sérum au lieu d'être diminuée.* Ce renforcement est, d'ailleurs, dû à une action physique que nous avons étudiée longuement dans un paragraphe précédent. *Il ne paraît donc pas y avoir d'antidiastase produite*; au cas où celle-ci existerait, elle n'existerait que dans de faibles proportions qui seraient alors masquées par l'action de renforcement du pouvoir diastasique dû au milieu albumineux du sérum.

Il nous restait à faire une seconde épreuve pour vérifier que les injections subintrantes de diastase n'avaient produit aucune immunisation : on injecta le chien de la dose mortelle minima de pouvoir diastasique par kilogramme : la mort se produisit dans les mêmes conditions, avec le tableau habituel : même rapidité, mêmes contractures, même production d'ammoniaque dans le sang et les organes. *Il n'y avait donc ni antidiastase ni immunisation.*

Nous avons, néanmoins, recommencé une deuxième expé-

rience en injectant, tous les deux ou trois jours environ, des quantités de diastase sensiblement plus fortes. En seize jours nous avons injecté, à six reprises différentes, 105 cent. cubes de diastase en commençant par 10 cent. cubes pour finir par une dose massive de 40 cent. cubes. Le chien supporta assez bien ces doses et l'on ne vit apparaître, en laissant deux ou trois jours de repos entre chaque injection, ni hématurie, ni albumine urinaire. Le rapport $\frac{\text{N urée}}{\text{N.NH}^3}$ faiblit un peu après chaque injection et le taux ammoniacal du sang ne s'accrut pas. En un mot, nous avons l'impression que nous avons fait pénétrer dans l'organisme un maximum de pouvoir diastasique, sans produire de lésions graves qui puissent annihiler les fonctions défensives et productrices de corps antidiastasiques. Après la dernière injection de 40 cent. cubes seulement, qui était de beaucoup supérieure aux autres, on vit le taux ammoniacal du sang augmenter d'une façon nette et le chien perdre de sa vivacité. Il y avait, en effet, 0 gr. 004 $N.NH^3$ p. 1.000 de sang, alors que le taux s'était maintenu auparavant entre 0,0001 et 0,00003. Des prises de sang, faites à partir de la troisième injection, n'indiquent ni pouvoir urolytique, ni pouvoir antidiastasique du sérum. Après la sixième injection seulement, il se manifeste un très léger pouvoir urolytique et une présence très nette d'anticorps. Le sérum, mêlé à la macération diastasique *in vitro*, produit en quelques minutes un volumineux précipité qui augmente à l'étuve à 37°. Néanmoins tous nos efforts pour annihiler le pouvoir diastasique furent vains. Quelles que soient les proportions de sérum et de macération diastasique qui furent mélangées, nous n'obtînmes, en dehors de la précipitation, aucune diminution du pouvoir urolytique. Il n'y a dans le sérum du chien que des *précipitines des corps contenus dans la macération*, mais qui ne sont que les soutiens de la diastase. La diastase mêlée à du sérum précipitant dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, filtrée après deux heures d'étuve à 37° et séparée du précipité produit, a toujours une activité correspondant à celle de la diastase pure. Le support de la diastase, qu'on ne peut séparer par aucun procédé, produit dans l'organisme des anticorps capables de précipiter ce support ou une partie de ce

support sans toutefois toucher à la diastase. Peut-être y a-t-il là un procédé possible de purification des diastases. Mais ce n'était point là ce que nous recherchions.

b) Voie intraveineuse. — Nous avons tenté alors la voie intraveineuse qui paraît être la voie la plus active pour l'obtention d'anticorps, mais que nous n'avions pas utilisé d'emblée craignant d'affaiblir l'organisme en l'intoxiquant. A notre grand étonnement, et comme nous l'avons déjà dit, le chien supporta très bien ces injections et l'on put, par ce procédé, sans le moindre dommage introduire en cinq jours 50 cent. cubes de diastase, ce qui correspond à la dose toxique; vingt-quatre heures après la cinquième injection, le sang ne révéla ni pouvoir urolytique, ni pouvoir antidiastasique. Le chien a grossi de 1 kilogramme pendant le traitement. Nous injectons alors 39 de pouvoir diastasique par kilogramme, ce qui est nettement inférieur au pouvoir diastasique mortel. L'animal meurt rapidement (trois quarts d'heure au lieu de deux heures) avec le tableau habituel, la phase comateuse se manifestant plus rapidement après l'injection. *Le chien semble avoir été sensibilisé* par nos injections intraveineuses subintrantes, puisqu'il meurt plus vite avec des doses moindres, cependant que la production d'$N.NH^3$ dans le sang et les organes est identique aux autres expériences

Cette seconde expérience nous donna l'idée d'étudier l'*action sensibilisante* que pourraient avoir des injections intraveineuses successives. Sur ce chapitre nous sommes encore peu avancés. La seule expérience que nous ayons pu faire et qui ne nous a pas donné de résultats concluants est celle-ci : nous injectons à un chien une dose forte, mais non mortelle, de macération diastasique. L'animal, peu chargé en urée (0,056. N uréique), a tout son N uréique transformé en $N.NH^3$; mais, le taux n'étant pas mortel, le chien supporte très bien cette injection. Le surlendemain, on réinjecte au chien une dose faible (13 de pouvoir diastasique par kilogramme) et l'on étudie les modifications produites sur l'N uréique. Celles-ci paraissent être d'une intensité égale à celles produites par la même dose (13 de pouvoir diastasique par kilogramme) sans injection préparante. Nous ne tirons aucune conclusion actuelle de cette expérience qui devra être reprise méthodiquement pour

montrer s'il existe, ou non, une action sensibilisante nette.

Bien des points restent d'ailleurs encore à élucider : car la précision chimique des résultats donne à l'étude de l'uréase une grande importance pour la connaissance des lois relatives à l'action des diastases *in vivo*.

CONCLUSIONS

1° ACTION DE L'URÉASE *in vitro* SUR LES HUMEURS DE L'ORGANISME. — Nos expériences ont confirmé que l'uréase détruit totalement et rapidement l'urée du sang. Celui-ci n'exerce en quarante-huit heures aucune action empêchante sur la diastase ; en solution diluée il exerce une action nettement protectrice. Cette action est indépendante de la teneur en sels minéraux et de l'alcalinité du sérum, elle n'est pas due à une substance thermolabile à 65°.

2° DESTINÉE DE L'URÉASE INJECTÉE DANS L'ORGANISME. — L'uréase disparaît lentement du milieu sanguin où on l'a injectée (vingt-quatre heures). On la retrouve fixée à des taux différents sur les divers organes. Le foie paraît être l'organe où elle se fixe le plus.

On ne retrouve jamais d'uréase dans l'urine.

3° ACTION TOXINIQUE DE L'URÉASE *in vivo*. — *a*) Intoxication aiguë (par injection intraveineuse). L'action est rapide, la destruction totale de l'urée est pour ainsi dire instantanée. L'animal meurt d'ammoniémie en deux à trois heures.

b) Intoxication subaiguë (par injection sous-épidermique). L'action est plus lente et met quarante-huit heures à se développer. Le mécanisme d'intoxication est identique à celui de l'intoxication par injection intraveineuse.

c) Intoxication chronique (par injection intraveineuse ou sous-épidermique). Tant que la quantité d'uréase injectée n'arrive pas à produire une quantité d'ammoniaque supérieure à celle que le foie peut arriver à détruire, l'animal résiste. Il meurt dès que l'organisme commence à s'enrichir en NH^3.

En général ces intoxications sont comparables à celles obtenues par l'injection de sels ammoniacaux à acides faibles.

L'ammoniémie produite par la diastase aboutit à une intoxication de type cérébral caractérisée d'abord par des convulsions, puis par du coma.

La mort survient lorsque l'ammoniémie atteint le seuil de 0,07 d'azote ammoniacal par kilogramme de sang.

d) Intoxication *per os*. Nous ne sommes pas arrivés à réaliser une intoxication par ce mode d'introduction.

e) Intoxication intracérébrale. On a reproduit l'intoxication ammoniémique en injectant directement la diastase dans le cerveau, la neurolyse est comparable à celle obtenue par injection veineuse.

4° Action réversive du foie. — Nous avons mis en lumière l'action réversive du foie en supprimant fonctionnellement cet organe, soit par injections de chloroforme, soit par ligature de la veine porte. Dans ces cas l'intoxication ammoniacale se produit plus rapidement puisque l'action réversive du foie n'entre pas en jeu.

5° Anticorps et sensibilisatrice. — Nous ne sommes pas arrivés à faire produire à l'organisme du chien une antidiastase. Nous avons obtenu simplement une précipitine du support de la diastase.

Nous n'avons pu mettre en évidence la sensibilisation de l'organisme à l'action de la diastase par des injections préparantes.

RECHERCHES SUR LES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

par Pierre THOMAS.

PREMIÈRE PARTIE

PRÉPARATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Les premiers essais systématiques d'extraction des protéiques de la levure remontent à l'année 1844; c'est Schlossberger (1) qui, le premier, en a extrait par l'action de la potasse étendue, suivie de filtration et de précipitation par l'acide sulfurique, un corps contenant de 13,75 à 14 p. 100 d'azote et possédant quelques-unes des réactions colorées des protéiques. Nægeli et Lœw, dans leurs recherches sur la composition chimique de la levure (2), extraient soit par macération, soit par ébullition avec l'eau, des corps mal définis, paraissant appartenir au groupe des protéines simples.

Jusque-là, la teneur de la levure en protéiques est loin d'être fixée. Ainsi Payen (3) indique une teneur en matière azotée de 62,73 p. 100, tandis que Nægeli et Lœw donnent 45 p. 100 de protéiques avec 2 p. 100 de peptones et 4 p. 100 de matières extractives (azotées?). D'après Stutzer (4), sur une teneur de 7,77 p. 100 en azote de la levure, 5,519 p. 100 appartiennent aux protéines et 2,257 p. 100 aux nucléines, soit un rapport de 5/7 à 2/7 environ. D'autre part, il y aurait 63,80 p. 100 d'albumines et 26,10 p. 100 de nucléines.

Bokorny (5), sans chercher à extraire les matières protéiques elles-mêmes, fixe la quantité d'albumine que renferme la levure à 3,50 — 9,00 p. 100.

(1) Schlossberger. *Liebig's Ann. d. Chem. u. Pharmazie*, 1844, **51**, p. 193.
(2) Nægeli et Lœw. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, **17**, p. 403, et aussi *Liebig's Ann.*, **193**, p. 322.
(3) Payen. *Mémoires présentés par divers savants étrangers*, **9**, p. 32.
(4) Stutzer, *Zeitsch. physiol. Chem.* 1882, **6**, p. 572.
(5) Bokorny. *Zeitsch. f. Spiritus industrie*, 1900, **13**, p. 33.

En somme, aucun des précédents auteurs n'a eu entre les mains de produits correspondant vraiment à ceux qui forment le protoplasma de la levure. Il fallait la méthode de Buchner pour arriver à extraire le contenu cellulaire et expérimenter avec lui. E. Buchner signale déjà un fait précis : c'est que le suc de presse qu'il obtient renferme « des albumines coagulables comme celles des organes des animaux » (1). Mais c'est Wroblewski (2) qui extrait le premier du suc de levure de Buchner des protéines. Il procède par coagulations successives et obtient des corps coagulant à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68°; il montre que ces corps précipitent par saturation partielle ou totale avec le sulfate d'ammonium ou par addition d'alcool.

Quelques années plus tard, R. Schrœder (3) réussit, par une méthode différente, à préparer des protéiques coagulables en partant de la levure. Il mélange la levure pressée avec de l'éther, qui détermine une plasmolyse énergique. La masse se liquéfie, et abandonne alors à l'eau une substance que l'on peut en séparer en la coagulant par chauffage à l'ébullition. Ce produit, lavé et séché, renferme C = 52,38; H = 6,91; N = 15,80 à 15,92; S = 0,72; P = 0,06; cendres = 0,14. Il possède la plupart des réactions des protéiques (4).

Enfin, Sedlmayr (5) aurait pu obtenir une albumine coagulable en traitant par une solution de carbonate d'ammonium de la levure tuée par l'alcool.

Je ne dois pas oublier de mentionner que, bien avant ces recherches, A. Kossel (6) avait réussi à extraire de la levure d'autres produits définis, appartenant au groupe des nucléines; mais il s'agit évidemment ici de produits dus à l'action des réactifs et non préexistants dans la cellule. Kossel traite la levure lavée par de la soude très diluée, filtre et recueille le liquide filtré dans l'acide chlorhydrique étendu. Il obtient un

(1) E. Buchner, H. Buchner et M. Hahn. *Die Zymasegährung*, Munich et Berlin, 1903, p. 73.

(2) Wroblewski. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 3218.

(3) R. Schroeder. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 389.

(4) La méthode employée par Schrœder avait déjà fait l'objet d'un brevet pris en 1899 par H. Buchner et M. Gruber. La même année, Dormeyer (*Woch. f. Brauerei*, 1899, **16**, p. 557) avait conseillé l'emploi d'éther et de chloroforme; un peu plus tard, Hahn et Geret (*Zeitsch. f. Biol.*, 1900, **40**, p. 117) utilisent dans le même but le chloroforme.

(5) Sedlmayr. *Zeitsch. f. d. gesam. Brauwesen*, 1903, **26**, p. 381.

(6) A. Kossel. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1879, **3**, p. 284; 1880, **4**, p. 290.

précipité qui, après lavage, présente la composition : C = 40,81 ; H = 5,38 ; N = 15,98 ; P = 6,19 ; S = 0,38. Dans des préparations ultérieures, il trouve pour le phosphore les valeurs : 3,28 ; 3,55 ; 3,94 et ne réussit pas à obtenir un corps aussi riche en phosphore que la première fois. Il observe ensuite que ce produit laisse par ébullition avec de l'eau des bases puriques, surtout l'hypoxanthine ; plus tard, il en extrait également la xanthine et la guanine.

La constitution des substances ayant pour origine le noyau de la cellule de levure était donc assez bien connue, tandis que presque rien n'était fait relativement aux matières protoplasmiques de cette même cellule. Malgré les difficultés d'une semblable étude, j'ai essayé de l'aborder, afin d'éclairer, s'il était possible, par l'étude des propriétés et de la structure des protéiques de la levure, leur origine et leur formation.

Extraction des protéiques de la levure.

La meilleure méthode, semble-t-il, pour isoler les constituants du protoplasme de la levure, consiste à faire exsuder celui-ci hors de l'enveloppe cellulaire, par un phénomène osmotique, ou par déchirure de cette enveloppe. C'est en somme la base des procédés employés pour l'obtention de la zymase.

Dès 1897, E. Buchner (1) obtient, par broyage des cellules de levure avec du sable quartzeux et de la terre d'infusoires, puis expression sous une pression élevée, un « suc de presse » qui contient avec les protéiques de la levure la zymase.

Au début de 1911, A. Lebedew (2) fait connaître une méthode beaucoup plus simple : il exprime de la levure fraîche de façon à en retirer la plus grande quantité de l'eau interposée, puis dessèche la masse pulvérulente, soit à la température ordinaire, soit mieux vers 30°. Il suffit de faire macérer la poudre obtenue avec de l'eau pendant plusieurs heures, puis de filtrer sur papier, pour obtenir une macération riche en protéiques et fortement zymasique.

A la fin de la même année, Giglioni (3) a montré que de la

(1) E. Buchner. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1897, **30**, p. 117.
(2) A. Lebedew. *C. R. Acad. des Sciences*, 1911, **152**, p. 49.
(3) Giglioni. *Atti della Soc. ital. p. Progresso d. Scienze*, octobre 1911.

levure exprimée jusqu'à ce qu'elle soit devenue pulvérulente, puis exposée aux vapeurs de chloroforme, d'éther, d'eucalyptol ou de camphre, se liquéfie et donne par filtration un liquide zymasique.

Cette dernière méthode correspond en somme au procédé de Schrœder pour la préparation des protéiques de levure. En répétant les expériences de ce dernier auteur, il m'a paru que les produits obtenus, ainsi que le rendement, sont sujets à d'assez grandes variations. Les diastases protéolytiques ne sont pas suffisamment entravées dans leur action et par suite le résultat de la préparation est souvent incertain; c'est ce qui m'a déterminé à abandonner cette méthode.

J'aurais pu, en préparant le suc de presse de Buchner, refaire et compléter le travail de Wroblewski; mais la préparation du suc de levure par broyage et expression est assez pénible, surtout lorsque l'on doit opérer sur des quantités un peu considérables ; elle exige, en plus du matériel spécial indispensable, un personnel suffisant.

Il n'en est plus de même si on emploie le procédé indiqué par Lebedew pour la préparation de son suc de levure : cette remarquable méthode présente la commodité et la simplicité les plus grandes, et il devient facile d'opérer sur des quantités quelconques. Il ne restait qu'à adapter les données de l'auteur au but spécial poursuivi, c'est-à-dire d'une part extraire et séparer les protéiques de la levure, et d'autre part empêcher leur altération en augmentant le rendement.

Mes premiers essais ont été effectués avec une préparation industrielle de levure obtenue d'après les indications de Lebedew (1). La première idée qui se présentait naturellement à l'esprit était de déterminer la proportion relative d'azote sous forme coagulable et non coagulable existant dans la macération préparée d'après Lebedew, mais en ajoutant un volume beaucoup plus considérable d'eau, afin de mieux épuiser cette levure.

Dans ce but, 200 grammes de levure Schroder, pulvérisée au préalable, ont été délayés dans 600 cent. cubes d'eau et la macération laissée à l'étuve à 35° pendant quatre heures, en agitant de temps à autre. On filtre ensuite

(1) Préparée par Schroder, de Munich, sous le nom de Trockenhefe.

sur papier Chardin; après dix-huit heures, on recueille un volume de 190 cent. cubes (liquide A).

Le résidu de l'épuisement, resté sur le filtre, est délayé dans 600 cent. cubes d'eau et remis à l'étuve à 35°. Après quatre heures et demie, on filtre; on recueille 500 cent. cubes (liquide B).

Enfin, le résidu a été de nouveau délayé dans 600 cent. cubes et macéré cinq heures à 35°. On recueille par filtration 450 cent. cubes (liquide C).

Pour déterminer la quantité de substances coagulables contenue dans ces liquides, on en prélève exactement 5 cent. cubes (aussitôt après filtration), on ajoute 50 cent. cubes d'eau et 1 gramme de chlorure de sodium, puis on porte à l'ébullition après addition de quelques gouttes d'acide acétique. La réaction est nettement acide. On filtre sur un petit filtre sans plis, en papier Chardin, et on lave jusqu'à ce qu'une goutte, recueillie sur un verre de montre, ne donne plus de louche sensible par le nitrate d'argent. Le coagulum est alors détaché du filtre et séché à 110° jusqu'à poids constant.

D'autre part, les liquides filtrés après coagulation sont évaporés à sec et on y dose l'azote total par la méthode de Kjeldahl.

Comme il est facile de s'en rendre compte, les liquides restant après coagulation renferment à peu près autant d'azote que le coagulum obtenu.

Les liquides A, B et C, aussitôt recueillis, sont additionnés de leur volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium; il se fait un léger précipité que l'on sépare par filtration et le liquide légèrement acidulé est aussitôt coagulé par chauffage à 100° pendant une demi-heure. Le coagulum lavé à l'eau bouillante est ensuite essoré et lavé jusqu'à disparition du sulfate d'ammonium.

Les liquides A, B et C donnent toutes les réactions de précipitation des protéiques :

Par les acides (sulfurique, nitrique, chlorhydrique, trichloracétique, acétique)	précipité blanc.
— l'acide phosphotungstique	blanc.
— le ferrocyanure acétique	blanc jaunâtre.
— l'acide picrique	jaune.
— l'iodure de potassium et de mercure	jaunâtre.
— l'iodure de potassium et de bismuth	orangé.
— le chlorure mercurique	blanc.
— le chlorure de platine	jaunâtre.
— l'iodure de potassium iodé	jaune.
— l'acide métaphosphorique	blanc.

Ces liquides, aussi bien que le coagulum purifié, donnent toutes les réactions colorées des protéiques; ces réactions n'ont pas la même intensité :

Xanthoprotéique, MILLON, biuret	intense.
HOPKINS	moyenne.
LIEBERMANN	très intense.
Aldéhyde d'EHRLICH et acide sulfurique	rouge très intense.
Soufre	faible.

Il s'agit donc d'une protéine soluble à l'eau et coagulable par la chaleur, vraisemblablement du groupe des albumines.

De nombreux essais ont été entrepris afin d'augmenter le rendement en protéiques, par l'emploi de solvants divers, et en faisant varier la durée de la macération. Il résulte de ces expériences que l'extraction à l'eau salée est défavorable, mais celle à l'eau alcaline donne des rendements plus élevés qu'avec l'eau pure.

Étant donné que les macérations deviennent peu à peu acides et que cette réaction favorise l'endotryptase de la levure, ainsi que l'ont montré Hahn et Geret (1), il n'y a rien de surprenant à ce que les matières coagulables soient plus abondantes dans l'extrait fait au moyen d'eau alcaline.

Hahn et Geret donnent les chiffres suivants pour le poids de coagulum formé dans le suc de levure lorsque l'on ajoute des quantités variables de carbonate de sodium :

Carbonate de sodium	Poids de coagulum
0	28,1
Q. S. pour neutraliser	43,0
0,2 p. 100 en plus	59,2
0,5 — —	72,3

J'ai essayé de maintenir la réaction à peu près neutre par addition progressive de carbonate de sodium.

Une macération de 100 grammes de levure Schroder dans 600 cent. cubes d'eau, abandonnée neuf heures dans l'étuve à 35°, a été ramenée toutes les heures à une très légère alcalinité par addition d'une solution concentrée de carbonate de sodium. On a recueilli par filtration 400 cent. cubes de liquide limpide opalescent.

Coagulum obtenu : 2 gr. 22 p. 100 contenant azote coagulable. . . 0,355 p. 100
— 2 gr. 22 — — non coagulable 0,372 —
Poids de coagulum : 2,22 × 4 = 8 gr. 88.

Le rendement est visiblement supérieur, mais il est évidemment peu pratique de surveiller sans cesse la macération pour en maintenir la neutralité.

(1) M. HAHN et L. GERET. *Die Zymasegährung*, 2e partie, p. 318.

L'influence de quantités croissantes d'alcali sur le rendement a été alors examinée.

Il en ressort que la concentration en carbonate de sodium la plus favorable, dans les conditions de l'expérience (durée, dilution, température), est de 0,50 p. 100.

Il fallait aussi fixer le rôle de la température. Dans ce but, on a fait une série d'essais, d'après lesquels on est fondé à employer la température de 35°.

Ces conditions, macération dans un assez grand volume de liquide, emploi d'eau alcalinisée avec 0,5 p. 100 de carbonate de sodium, température de 35°, donnent les meilleurs résultats pour une préparation rapide et pratique des protéiques de la levure. Le rendement serait certes amélioré par d'autres précautions : épuisements réitérés, contrôle continuel de la réaction légèrement alcaline qu'il faudrait maintenir, etc., mais le procédé deviendrait d'une application vraiment pénible et exigerait trop de temps.

Lorsque l'on opère sur des masses un peu considérables, en plaçant la macération à l'étuve, il ne faut pas oublier que l'opération doit être prolongée assez longtemps, en raison de la lenteur avec laquelle la température s'élève. Pour une macération de 100 grammes de levure Schroder dans un litre d'eau alcaline, laissée pendant huit heures à l'étuve à 35°, l'élévation à partir d'une température initiale de 18° n'est que de 5° en moyenne pendant les deux premières heures et de 4° pendant la troisième. Ce n'est guère qu'après cinq heures que la température est voisine du degré cherché. Aussi est-il préférable d'employer de l'eau préalablement chauffée à 35° si on veut diminuer la durée de la macération.

Séparation des protéiques obtenus.

Nous avons vu précédemment que le produit de l'épuisement de la levure séchée de Schroder par l'eau donne avec le sulfate d'ammonium à demi-saturation un léger précipité. S'agit-il d'une globuline? Quelle est la nature du protéique coagulable par la chaleur? Est-il formé d'une substance unique? Autant de questions auxquelles je me suis efforcé de répondre.

Une macération aqueuse de 100 grammes de levure Schroder dans six parties d'eau distillée, prolongée sept heures et demie à la température de 35°, a donné, après filtration, 370 cent. cubes de liquide renfermant 1,77 p. 100 de protéiques, soit en tout 6 gr. 55; le liquide contient 0,34 p. 100 d'azote non coagulable. Une certaine quantité de ce liquide, additionnée de son volume de solution saturée de chlorure de sodium, ne donne aucun trouble, même après contact prolongé ; il ne renferme donc pas de globulines du groupe du fibrinogène.

On prend 100 cent. cubes de la macération primitive et on les sature à froid, en agitant, avec du sulfate de magnésium cristallisé en poudre fine. On termine la saturation à l'étuve à 28°. Le trouble assez abondant qui se forme est séparé par filtration et le dépôt lavé avec un peu de solution saturée de sulfate de magnésium. On redissout dans l'eau la partie insoluble, on filtre, on acidule par l'acide acétique et on chauffe à l'ébullition. Il se fait une coagulation incomplète ; le liquide filtré reste, en effet, opalescent et renferme encore une notable quantité de protéiques. Quant au coagulum resté sur le filtre, lavé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de réaction des sulfates, il pèse après dessiccation 0 gr. 646, soit environ 36 p. 100 de la quantité totale. Ce coagulum paraît renfermer une certaine quantité d'une albumine coagulable entraînée par la précipitation saline en même temps qu'un autre protéique, ce dernier ne se séparant pas complètement par chauffage. Il convient donc de faire des essais de purification par précipitations répétées.

Dans ce but, on prépare une nouvelle macération dont on obtient par filtration 560 cent. cubes contenant 9 gr. 57 de protéiques. On précipite par un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, on filtre et le résidu est traité par une petite quantité d'eau. La dissolution est incomplète ; on centrifuge et on obtient un premier résidu insoluble R_1. Le liquide clair, dont le volume est de 92 cent. cubes, est reprécipité par son volume de sulfate d'ammonium à saturation : précipité blanc floconneux, qui est traité à deux reprises par peu d'eau, en présence de quelques gouttes de solution saline. On centrifuge et on a un second résidu R_2. En traitant de même la liqueur claire décantée, on a un troisième résidu insoluble R_3.

Les liquides résultant des dernières dissolutions par l'eau contenant seulement une petite quantité de sels, étant acidulés par l'acide acétique et portés à l'ébullition, ne donnent qu'un léger louche sans coagulum visible dans le dernier cas. Il n'existe donc plus d'albumine coagulable. Quant aux résidus R_1, R_2, R_3, insolubles dans l'eau contenant seulement de très petites quantités de sels, ils se dissolvent dans l'eau alcalinisée par 0,5 p. 100 de carbonate de sodium. La solution est complète, légèrement opalescente et filtre assez facilement. Par addition d'acide acétique dilué, on a un précipité floconneux blanc qui se redissout en entier dans l'eau alcaline et reprécipite par l'acide acétique.

Ce produit est très riche en azote, comme le montre un essai rapide; on le fond avec un mélange de potasse et de nitrate de potassium pour y rechercher la présence du phosphore. La recherche est positive et montre la présence d'une quantité notable de cet élément. La recherche du fer est également positive.

Cette expérience, répétée dans les mêmes conditions avec une macération dans l'eau salée à 10 p. 100, donne les mêmes résultats, à savoir que le précipité obtenu par le sulfate de magnésium ou par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ne se redissout après purification que dans les solutions alcalines; il en est reprécipité par les acides et contient du phosphore et du fer.

Ces caractères ne paraissent pas correspondre avec ceux d'une globuline vraie. Afin de voir si la précipitation saline correspond à celle faite au moyen des acides, on dispose l'expérience suivante.

Une macération de 100 grammes de levure Schroder dans six parties d'eau distillée est maintenue au voisinage de la neutralité par additions fréquentes de carbonate de sodium à 10 p. 100. Le séjour à l'étuve à 35° est de neuf heures. On filtre et on recueille 420 cent. cubes de liquide contenant 2,22 p. 100 de protéiques coagulables et 0,37 p. 100 d'azote non coagulable.

On prélève deux portions égales de 200 cent. cubes de liquide. L'une est précipitée par son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium; on filtre et on redissout dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100, on filtre à nouveau et on reprécipite par l'acide acétique. Le précipité séché dans le vide sur l'acide sulfurique pèse 0 gr. 24. Quant au liquide primitif, il est dialysé pendant quelques heures dans des sacs de collodion pour le débarrasser de la plus grande partie du sulfate d'ammonium, puis acidulé et coagulé par la chaleur. Le coagulum lavé et séché pèse 3 gr. 04.

On retrouve ainsi 0,24 + 3,04 = 3 gr. 28 sur 4 gr. 44 de protéiques.

La seconde portion de 200 cent. cubes est précipité par 2 cent. cubes d'acide acétique, soit 1 p. 100; on filtre rapidement et le précipité est redissous dans le carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On reprécipite par l'acide acétique ajouté goutte à goutte, on lave et on sèche dans le vide sulfurique. Poids obtenu : 0 gr. 19. Le liquide filtré après la précipitation acétique est aussitôt coagulé par la chaleur; on obtient après lavage et dessiccation 3,26 de coagulum.

On retrouve ainsi 0,19 + 3,26 = 3 gr. 45 sur 4 gr. 44 de protéiques.

Comme on le voit, les deux expériences sont comparables. Elles laissent toutes deux place pour une autolyse accentuée qui se traduit par une perte de 23 à 26 p. 100 de protéiques.

Il est beaucoup plus commode, pour séparer les deux substances présentes dans les macérations, de recourir à la précipitation acétique. Afin de fixer les proportions relatives de ces protéiques tout en améliorant le rendement, on procède à l'expérience suivante : trois échantillons de levure Schroder

ont été mis à macérer dans dix parties d'eau alcaline pendant huit heures à 35°.

A. — *Macération dans le carbonate de sodium à* 0,1 p. 100.

Volume obtenu : 760 c.c. contenant 0,78 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 5 gr. 928 et 0,227 p. 100 d'azote non coagulable.

On précipite par l'acide acétique; le précipité essoré et séché dans le vide pèse 1 gr. 31. Le liquide filtré, coagulé par chauffage, donne après lavage et dessiccation un poids de 4 gr. 66 de protéiques.

$$\text{Rapport : } \frac{1,31}{4,66} = \frac{22}{78} = \frac{1}{3,5} \text{ environ.}$$

B. — *Macération dans le carbonate de sodium à* 0,2 p. 100.

Volume obtenu : 760 c. c. contenant 0,92 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 6 gr. 992 et 0,218 p. 100 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 54.

Poids du coagulum : 6 gr. 04.

$$\text{Rapport : } \frac{1,54}{6,04} = \frac{20}{80} = \frac{1}{4} \text{ environ.}$$

C. — *Macération dans le carbonate de sodium à* 0,5 p. 100.

Volume obtenu : 740 c.c. contenant 1,28 p. 100 de protéiques coagulables, soit en tout 9 gr. 47 et 0,213 p. 100 d'azote non coagulable.

Poids du précipité acétique : 1 gr. 57.

Poids du coagulum : 7 gr. 91.

$$\text{Rapport : } \frac{1,57}{7,91} = \frac{16,5}{83,5} = \frac{1}{5} \text{ environ.}$$

D'une façon générale, on voit que les quantités relatives des deux substances varient peu : cependant, l'élévation du taux de l'alcalinité, qui gêne de plus en plus l'autolyse de la levure, ne paraît pas influer beaucoup sur la quantité du précipité acétique, tandis qu'elle augmente la teneur en albumine coagulable. On pourrait en conclure que la substance précipitable par l'acide acétique n'est pas produite par un processus d'autolyse ou de dissolution, mais se trouve déjà formée dans le contenu cellulaire. Il en est probablement de même de l'albumine coagulable par la chaleur; celle-ci apparaît en quantité d'autant plus élevée que l'alcalinité est plus grande parce qu'elle est beaucoup plus attaquable que l'autre protéique, en milieu acide, sous l'action de l'endotryptase. Quoi qu'il en soit, le rendement est le meilleur lorsque l'extraction est faite avec une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100.

Les proportions des deux protéiques, dans l'expérience qui

précède, restent voisines de une partie du premier pour quatre parties du second. Cependant, elles semblent sujettes à varier dans des limites assez étendues. Le rendement en protéique précipitable par l'acide acétique est plus élevé lorsque l'on opère en plus grand, avec une quantité de levure atteignant 400 à 800 grammes. Il varie aussi avec l'espèce de levure, mais sans qu'il soit possible de fixer une limite certaine en raison de l'impossibilité de supprimer complètement l'action de la protéolyse.

Dans une expérience faite avec 700 grammes de levure Schroder, délayée dans dix parties d'eau alcalinisée avec 0,50 p. 100 de carbonate de sodium et macérée huit heures à 35-36°, j'ai obtenu 49 grammes d'albumine coagulable, lavée et séchée à 110°, et 20 grammes de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation, lavé et séché dans le vide sulfurique.

D'autre part, j'ai opéré avec la levure pressée du commerce. Deux kilogrammes de cette levure (1), exprimés fortement à la presse et tamisés, donnent une poudre blanche qui est séchée en couche mince à l'étuve à 38° pendant quarante-six heures. On broie finement dans un moulin pour pulvériser les grains de couleur jaune brun qui se sont formés. La poudre, dont le poids est de 400 grammes, est mise à macérer dans dix parties d'eau contenant 0,5 p. 100 de carbonate de sodium pendant sept heures à l'étuve à 35°. On obtient seulement 22,8 d'albumine et 9,5 de précipité acétique purifié par dissolution et reprécipitation comme plus haut. Voici les résultats comparatifs :

	Levures	
	Schroder	Springer
Précipité acétique p. 100 de levure	2,9	2,4
Albumine coagulable	7,0	5,7
Rapport entre les deux protéiques	1 : 2,4	1 : 2,5
Rendement total	9,9	8,0

Je me suis finalement arrêté au procédé suivant pour la préparation de ces protéiques :

1) Il s'agissait de levure Springer préparée à Maisons-Alfort.

La levure préparée selon les données de Lebedew est pulvérisée aussi finement que possible par passage dans un moulin à serrage variable, analogue à ceux que l'on emploie pour pulvériser les graines dures. La poudre est délayée avec soin dans dix parties de solution de carbonate de sodium (carbonate sec et pur) à 0,5 p. 100 préalablement chauffée à 37-38°. On abandonne huit heures à l'étuve à 35° en agitant assez souvent. La masse est alors mélangée et répartie dans des filtres en papier Chardin disposés dans une glacière (entre + 2° et + 5°). Le lendemain les liqueurs filtrées sont réunies et précipitées par addition de 1 p. 100 d'acide acétique cristallisable. On vérifie que la précipitation est totale et on décante sur un filtre — ou on centrifuge si possible — de manière à séparer le précipité aussi rapidement que possible. Le liquide clair est additionné de 1 p. 100 de sel marin et porté rapidement à l'ébullition.

Le précipité acétique, lavé rapidement avec un peu d'eau, est dissous dans le moins possible de solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On filtre ou on centrifuge s'il est besoin et la solution est reprécipitée par l'acide acétique en quantité exactement nécessaire. On centrifuge, on lave à plusieurs reprises par centrifugation et on sèche dans le vide sulfurique. Toutes ces opérations doivent être faites aussi rapidement que possible.

Quant au coagulum obtenu par la chaleur, il est recueilli sur un filtre, lavé à l'eau bouillante à plusieurs reprises, essoré et séché à l'étuve à 105-110°.

DEUXIÈME PARTIE

NATURE DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

Etude du précipité fourni par l'acide acétique.

Ce corps semble se rapprocher par ses propriétés des nucléoprotéines ou plutôt de ces corps désignés improprement comme paranucléoprotéines et qui pour la plupart rentrent dans le groupe des phosphoprotéines (1). Je l'ai d'abord purifié par plusieurs dissolutions dans l'eau alcaline suivies de précipitations à l'acide acétique, ces opérations étant faites très rapidement grâce à l'emploi d'une centrifugeuse et au voisinage de 0°.

Le produit obtenu, après dessiccation à 35° dans le vide sulfurique, se présente sous forme d'une masse cornée, dure, donnant par pulvérisation au mortier une poudre jaune pâle. Il est insoluble dans l'eau, mais se dissout un peu dans une solution de sel marin à 10 p. 100 ; cette solution ne se coagule

(1) Pour la classification des protéiques voir *Proceed. of Amer. physiol. Society*, 20e ann. Comm., 1908.

pas par chauffage. On peut le dissoudre beaucoup plus facilement dans les carbonates alcalins et dans les alcalis très étendus, ainsi que dans l'eau de chaux. Les acides minéraux et l'acide acétique le précipitent de ces solutions. Dans la solution alcaline, l'acide phosphorique fait naître un précipité qui se redissout par un léger chauffage et reparaît par refroidissement.

Dosage de l'azote. — Ce dosage a été fait par la méthode de Kjeldahl, avec la modification de Maquenne (distillation avec l'hypophosphite de sodium) sur trois échantillons provenant de trois préparations différentes et préalablement séchés à 110° jusqu'à poids constant.

I.	0 gr. 1715 de substance	exigent	9 c.c. 9	$SO^4H^2n/5$,	soit 16,16	p. 100 N.
II.	0 gr. 2225	—	— 12 c.c. 8	—	16,107	—
III.	0 gr. 2690	—	— 15 c.c. 55	—	16,18	—

Dosage du soufre. — Un premier dosage a été fait par fusion de la substance avec un mélange de une partie de nitrate de potassium et neuf parties de carbonate de potassium. On redissout dans l'acide chlorhydrique et après filtration on précipite par le chlorure de baryum. On pèse le sulfate après lavage.

I. 2 gr. 624 de substance donnent 0 gr. 074 $BaSO^4$, soit 0,387 p. 100 S.

Un second échantillon a été traité par l'acide nitrique bouillant; après dissolution, on neutralise avec du carbonate de sodium, on évapore à sec et on chauffe au rouge dans un creuset de nickel. On reprend par l'acide chlorhydrique et on filtre. Le filtre et le charbon restant étant incinérés, on reprend par l'acide chlorhydrique et les liqueurs réunies sont précipitées par le chlorure de baryum.

II. 1 gr. 640 de substance donnent 0 gr. 0457 $BaSO^4$, soit 0,382 p. 100 S.

Dosage du phosphore. — La substance préalablement séchée à 110° et pesée a été mélangée intimement avec 0 gr. 20 de magnésie calcinée pure et incinérée avec précaution suivant les indications de Vozarik (1). On précipite à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.

(1) A. Vozarik. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **76**, p. 426.

I.	0 gr. 6765 de substance donnent	0 gr. 0425 $P^2O^7Mg^2$,	soit	1,75	p. 100 P.
II.	1 gr. 0480 — —	0 gr. 0690	—	1,835	—

Dosage des cendres. — Les deux échantillons ayant servi aux dosages ci-dessus ont donné, par incinération au four à moufle, au voisinage du rouge sombre, des cendres en quantité minime.

I.	1 gr. 282 de substance donnent	0 gr. 0055 de cendres,	soit	0,42	p. 100
II.	1 gr. 454 — —	0 gr. 0037	—	0,25	—

Ces cendres sont alcalines, entièrement solubles, et contiennent du phosphate et du sulfate de sodium et de potassium.

La substance donne les réactions colorées des protéiques à des degrés variables. Les réactions du biuret, de Millon, xanthoprotéique, sont intenses. La réaction glyoxylique est très nette; celle de Liebermann passe très rapidement au rouge brun foncé et celle de Molisch donne un rouge violet très intense. Enfin la réaction du soufre (par formation du sulfure de plomb) est naturellement peu intense.

* * *

Les propriétés de ce corps phosphoré me semblant devoir le rapprocher des substances du groupe de la caséine, je l'ai soumis à une étude comparative avec la caséine et l'ovovitelline.

J'ai déjà indiqué la faible solubilité de cette substance dans l'eau salée à 10 p. 100 et sa facile dissolution dans l'eau de chaux. Il était intéressant de déterminer la concentration en ions hydrogène nécessaire pour produire le début de la précipitation des trois protéiques à comparer. Dans ce but on a ajouté des quantités croissantes d'acide phosphorique à leurs solutions sodiques, en présence d'une série convenablement choisie d'indicateurs (hélianthine, rouge de méthyle, rouge neutre, naphtolphtaléine, phénolphtaléine) (1).

Si on appelle c la concentration en ions hydrogène, on a (Sœrensen) :

$$c = 10^{-p_H}.$$

(1) Je suis redevable de cette collection d'indicateurs à mon ami L. Margaillan, à qui j'adresse ici mes meilleurs remerciements.

L'exposant p_H a pour valeur, avec les indicateurs choisis :

	Acide	Alcalin
	—	—
Hélianthine.	3,1	4,4
Rouge de méthyle	4,2	6,3
Rouge neutre.	6,8	8,0
Naphtol-phtaléine.	7,4	8,5
Phénol-phtaléine	8,3	9,2

Avec la phosphoprotéine de levure, on peut voir que la précipitation n'a pas lieu en milieu alcalin à la phénolphtaléine; elle se produit en milieu alcalin à l'hélianthine, alcalin au rouge de méthyle mais encore acide au rouge neutre; le point de précipitation est donc compris entre $p_H = 6{,}3$ et $p_H = 6{,}8$.

En opérant de même avec de la caséine purifiée par plusieurs dissolutions et précipitations successives, on trouve que celle-ci précipite en milieu encore alcalin à l'hélianthine et acide au rouge neutre. La précipitation correspond très exactement au point neutre du rouge de méthyle, soit entre $p_H = 4{,}2$ et $p_H = 6{,}3$.

J'ai alors préparé de l'ovovitelline de la manière suivante :

Deux jaunes d'œuf très frais, dilués avec 40 cent. cubes de solution de sel marin à 10 p. 100, sont épuisés par l'éther à plusieurs reprises, jusqu'à ce que ce dissolvant n extraie plus qu'une trace infime de corps gras. Le liquide salé est siphonné et précipité par 20 volumes d'eau. On filtre, on essore et on lave le précipité à l'eau distillée; enfin, on redissout dans le plus petit volume possible d'eau salée à 10 p. 100 et on recommence la précipitation encore une fois.

La vitelline obtenue, encore une fois dissoute dans l'eau salée, est de nouveau reprécipitée. Une petite quantité de ce précipité étant dissoute dans quelques gouttes de soude normale, on étudie la précipitation par l'acide phosphorique; on peut constater qu'elle a lieu en milieu déjà acide à la phénolphtaléine, mais encore alcalin à la naphtolphtaléine; soit entre $p_H = 8{,}3$ et $p_H = 8{,}5$.

A noter que la vitelline, très peu soluble dans l'eau de chaux, se dissout très facilement dans l'eau salée à 10 p. 100; cette dernière solution est coagulable par la chaleur, à l'inverse de ce qui a lieu pour la caséine et la phosphoprotéine de levure.

Tous les caractères qui rapprochent cette phosphoprotéine

de levure de la caséine du lait rendaient nécessaire une comparaison basée sur l'action des présures soit animales, soit végétales.

J'ai choisi comme présure animale une solution d'un comprimé de présure Hansen du commerce dans 50 cent. cubes d'eau, et comme présure végétale une solution de papayotine de Merck à 0 gr. 2 pour 50 cent. cubes.

Des solutions à 4 p. 100 environ de phosphoprotéine de levure et de caséine dans la soude N/10 ont été additionnées d'acide phosphorique, la première jusqu'à légère acidité au rouge neutre, la seconde jusqu'à neutralité au même indicateur.

On place dans un bain réglé à 45° deux tubes contenant 10 cent. cubes de chaque solution auxquels on ajoute respectivement 1 cent. cube de chacune des solutions de présure. Après quelques instants, il est facile d'observer une forte augmentation de la viscosité des liquides. Si on ajoute à chacun des mélanges, avant de les placer au bain-marie, une goutte de solution de chlorure de calcium, on obtient une coagulation assez rapide dans tous les tubes : avec la papayotine, la coagulation de la phosphoprotéine de levure se produit même avant celle de la caséine; il se forme des grumeaux qui s'agglomèrent peu à peu en une masse solide.

L'expérience est répétée avec des solutions de caséine, de phosphoprotéine de levure et de vitelline dans de l'eau de chaux saturée. Ces solutions sont à 2 ou 3 pour 100 avec les deux premières ; pour la vitelline, moins soluble, la solution est saturée de ce corps. On neutralise au moyen d'acide phosphorique :

Pour la caséine, jusqu'à virage au rose du rouge neutre ($p_H = 7,0$) ;

Pour la protéine de levure, jusqu'au début de virage du rouge neutre ;

Pour la vitelline, jusqu'au voisinage de la neutralité à la naphtolphtaléine.

On ajoute à 10 cent. cubes des solutions, soit 1 cent. cube de présure Hansen, soit 1 cent. cube de papayotine Merck (comme plus haut) et on place au bain-marie à 42°; après une demi-heure on a les résultats suivants :

	Présure Hansen	Papayotine
Caséine	Coagulation.	Coagulation nette.
Protéine de levure. .	Coagulat. incomplète.	Coagule en grumeaux.
Ovovitelline	Léger précipité.	Précipité un peu aggloméré.

Il est à noter que l'ovovitelline ne coagule pas avec la présure animale; Gerber a montré que le jaune d'œuf coagule sous l'action de certaines présures végétales (1).

Il est indubitable que la phosphoprotéine de levure coagule en grumeaux sous l'action de la présure. C'est vraisemblablement ce phénomène qui a été observé dans le suc de levure de presse par Geret et Hahn (2) lorsque ce suc est abandonné à l'étuve à 37° et qui est décrit dans les termes suivants par Hahn : « Déjà après deux heures il y a une forte coagulation, en partie formée de globuline et de nucléine, *presque analogue à l'action du lab sur le lait*, qui se dépose bientôt. Ce coagulum se dissout presque totalement dans le chlorure de sodium à 10 p. 100 et dans le carbonate de sodium à 10 pour 100 » (3).

D'après cette description, on ne peut guère douter qu'il ne s'agisse de la phosphoprotéine que j'ai isolée.

Le même phénomène a dû intervenir dans l'expérience de Wroblewski, lequel, dialysant du suc de levure, a obtenu des flocons volumineux, solubles dans le chlorure de sodium à 10 p. 100, qu'il croit être une globubine (4); il est bien probable qu'il s'agit d'une coagulation par la présure du suc de levure, comme dans l'observation de Geret et Hahn.

Présure de la levure. — La présure existe dans la levure, comme l'a démontré Boullanger (5) en ensemençant directement le lait avec la levure : la coagulation est complète après deux mois seulement, ce qui indique que cette présure diffuse très lentement. Dans le suc de levure, il est difficile de la mettre en évidence en faisant agir ce suc sur une solution de phosphoprotéine, car la digestion sous l'action de la tryptase inter-

(1) Gerber. *C. R. Soc. de Biol.*, 1913, **74**, p. 53.
(2) Geret et Hahn. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 202.
(3) *Die Zymasegährung*, 2e partie, p. 293.
(4) Wroblewski. *Loc. cit.*
(5) Boullanger, Ces *Annales*, 1897, **11**, p. 720.

vient souvent avant que la coagulation apparaisse; on y arrive un peu plus commodément en faisant agir le suc de levure sur du lait.

Pour montrer l'existence de la présure, j'ai utilisé comparativement les trois méthodes suivantes :

a) Celle de Morgenroth (1), dans laquelle le liquide étudié est laissé en contact avec le lait, à la glacière, pendant vingt-quatre heures, avant d'être chauffé à 37°;

b) Celle de Blum et Fuld (2), qui opèrent le contact à la température ordinaire et chauffent ensuite comme le fait Morgenroth;

c) Enfin, le procédé ordinaire, où le mélange est aussitôt porté à 37°-40° et maintenu à cette température jusqu'à coagulation.

Dans aucun cas, les mélanges faits avec 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c.c. 5 et 1 cent. cube de suc de levure pour 10 cent. cubes de lait n'ont montré de coagulation, même après plusieurs heures à 37°. Un mélange fait avec 2 cent. cubes de suc pour 10 cent. cubes de lait donne après quatre heures, par la méthode à chaud, un coagulum en grumeaux volumineux, mais sans prise en masse; ce mélange ne donne rien par les méthodes à froid. Il fallait donc employer des proportions élevées de suc de levure.

Avec des doses de 2 à 5 cent. cubes de suc pour 10 cent. de lait, j'ai pu obtenir régulièrement la coagulation. Les mélanges étaient amenés à un égal volume (15 cent. cubes) avec de l'eau et placés aussitôt dans un bain-marie réglé à 38° avec des tubes témoins.

Voici les résultats obtenus :

Doses de suc de levure . .	2 c.c.	3 c.c.	4 c.c.	5 c.c.
Temps de coagulation . . .	4 h. 15	3 h. 30	2 h. 20	1 h. 45

Dans les deux derniers tubes, le liquide devenait très visqueux avant de se prendre en masse. Les tubes témoins n'ont montré aucune tendance à la coagulation.

(1) Morgenroth. *Centralbl. f. Bakter.*, 1899, **26**, p. 349. Voir aussi Fuld. *Bioch. Zeitsch.*, 1907, **4**, p. 54.

(2) L. Blum et E. Fuld. *Berlin. klin. Woch.*, 1905, n° 44.

L'existence d'une présure, à la vérité peu active, me semble donc démontrée dans le suc de levure préparé par le procédé de Lebedew.

*
* *

Les rapports entre la caséine, la phosphoprotéine de levure et l'ovovitelline sont résumés dans le tableau suivant :

	Caséine du lait.	Phosphoprotéine de levure	Vitelline de l'œuf
	—	—	—
Solubilité dans l'eau. .	Insoluble.	Insoluble.	Insoluble.
— NaCl à 10 p.100	Presque insoluble.	Peu soluble.	Très soluble.
— l'eau de chaux .	Très soluble.	Assez soluble.	Très peu soluble.
Valeur de p_H au début de la précipitation. .	4,2 — 6,3	6,3 — 6,8	8,3 — 8,5
Coagulation par la présure.	Complète.	Incomplète.	Nulle.

Le produit obtenu par précipitation acétique des macérations de levure a donc bien sa place entre la caséine et la vitelline, mais plus près de la première.

Son caractère de protéine phosphorée est encore affirmé par l'expérience suivante :

On dissout 5 grammes de produit (séché à 37° dans le vide sulfurique) dans 500 cent. cubes de soude à 10 p. 100 et on abandonne à l'étuve à 37°. Après quarante-huit heures, on prélève 100 cent. cubes de liquide dans lequel on dose le phosphore minéral. Pour cela, on acidule par l'acide acétique et on porte à l'ébullition. On filtre, on lave le précipité et dans les liqueurs réunies, additionnées d'acide citrique, on précipite l'acide phosphorique à la manière habituelle.

On obtient 0 gr. 022 de pyrophosphate magnésien correspondant à 0 gr. 03066 de phosphore pour la totalité du liquide. Comme le produit contenait 10,01 p. 100 d'eau, on peut calculer d'après sa teneur en phosphore de 1,835 p. 100 que la préparation renfermait en tout 0 gr. 08257 de phosphore. Il est donc passé en solution, sous l'action de la soude, et à l'état minéral, 37,1 p. 100 du phosphore total.

Après cinq jours, on obtient avec 100 cent. cubes de liquide prélevé un poids de 0 gr. 0345 de $P^2O^7Mg^2$, soit en tout 0 gr. 04808 de phosphore minéral. L'action de la soude a solubilisé 58,2 p. 100 du phosphore total.

Après neuf jours, 100 cent. cubes de liquide donnent 0 gr. 039 de $P^2O^7Mg^2$, correspondant à 0 gr. 05435 de phosphore pour la totalité de la solution, soit une proportion de 65,8 p. 100 du phosphore total solubilisé à l'état minéral.

Ce phénomène de la transformation progressive du phos-

phore des phosphoprotéines en phosphore minéral sous l'action de la soude étendue, signalé et étudié par Plimmer et Scott (1) pour la caséine et la vitelline, se retrouve donc avec le produit que j'ai extrait des macérations de levure.

Je propose de donner à cette protéine phosphorée le nom de *Zymocaséine* (de ζύμη, levain), sous lequel je la désignerai désormais (2).

Etude du coagulum fourni par chauffage.

Le liquide dont on a séparé la zymocaséine par l'acide acétique donne par chauffage un abondant coagulum, blanc, compact, semblable à l'ovalbumine obtenue par coagulation.

Ce corps peut être également obtenu par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium, employé à saturation. On recueille le précipité par centrifugation et on le lave avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. On peut le débarrasser de ce sel par dialyse dans un sac de collodion.

C'est une substance blanche, soluble dans l'eau, non précipitable par l'acide acétique, ni par le sulfate de magnésium saturé ou le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Elle présente donc les caractères des albumines.

La solution neutre ou légèrement acide commence à se troubler à 39-40° et donne à 41° un coagulum assez léger, mais très net (3). Si on filtre, on a un liquide limpide qui se trouble de nouveau à 49° et coagule en partie à 50°. Après filtration, on a un liquide clair donnant une coagulation très abondante à

(1) Plimmer et Scott. *Journ. of the chem. Society*, 1908, **93**, p. 1699.

(2) Il peut être intéressant de rappeler que Schlossberger (*loc. cit.*), en traitant la levure par la potasse étendue, et précipitant la solution obtenue par l'acide sulfurique, avait préparé un corps vraisemblablement de nature protéique, contenant environ 14 p. 100 d'azote, qu'il avait comparé à une variété de caséine. S'agissait-il de zymocaséine plus ou moins altérée? Je n'oserais l'affirmer; en tout cas, on pourrait risquer la même hypothèse avec plus de vraisemblance au sujet du corps isolé par Béchamp (*C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 645), des produits de l'autolyse de la levure en présence de phénol : cette substance, dit-il « est bien différente de l'albumine des œufs; c'est de la caséine qu'elle se rapproche le plus; comme celle-ci, elle se dissout aisément dans le carbonate de sodium après sa coagulation, ce que ne fait pas l'albumine coagulée; elle est précipitée de cette solution par l'acide acétique ».

(3) Ce fait a été d'abord signalé par E. Buchner, qui a constaté que le suc de levure se coagule déjà à 40° (*Die Zymasegährung*, p. 292).

partir de 55° jusqu'à 58°. Le liquide donne encore un léger coagulum à 61°, puis reste limpide jusqu'à 68° ; on a enfin une légère coagulation de 68° à 70°. Il ne se produit plus de trouble ensuite jusqu'à 98°. Pratiquement, si on ne procède pas par fractionnement, la coagulation paraît se poursuivre de 40° à 70°.

En étudiant le suc de levure de presse, Wroblewski (1) avait déjà signalé ces coagulations successives. Il les attribuait à une série de protéines distinctes, coagulant chacune pour son compte, à 41°, 51°, 56°, 59°, 62° et 68°. La première, d'après lui, pouvait être coagulée et séparée par agitation avec de l'éther dès la température de 35° ou être précipitée par l'acide acétique. Il ne m'a pas été possible de vérifier cette dernière assertion : la précipitation acétique du suc de levure sépare en effet la zymocaséine, qui n'est pas coagulable par la chaleur ; l'albumine restante commence à coaguler dès 41° si on a opéré assez vite pour éviter l'autolyse, ou si, comme je l'ai fait, on procède à toute la série des opérations dans une pièce dont la température reste comprise entre 2° et 3°. Ainsi que l'a remarqué Wroblewski, l'action de l'endotryptase a pour effet de supprimer les coagulations successives en élevant en quelque sorte la température de coagulation. Dans les idées de cet auteur, le ferment digestif attaquerait d'abord la protéine coagulant à 41°, puis celle qui coagule à 51° et ainsi de suite.

Il ne me paraît pas possible d'admettre cette manière de voir ni cette multiplicité de protéines qui seraient caractérisées seulement par leurs températures de coagulation. Ainsi que je l'ai déjà indiqué, je n'ai pu obtenir de globuline par précipitation du suc de levure au moyen du sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais seulement la même substance que par la précipitation acétique, c'est-à-dire la zymocaséine ; or, d'après Wroblewski, la protéine coagulant à 41° est précipitée par l'acide acétique, tandis qu'elle ne l'est pas avec une concentration de sulfate d'ammonium correspondant aux 2/3 de la saturation. Il y a là une contradiction qui s'explique peut-être par l'intervention, dans les expériences de Wroblewski, des ferments autolytiques si actifs du suc de levure.

(1) Wroblewski. *Loc. cit.*

Quant aux coagulations successives de l'albumine de levure, elles peuvent, à mon avis, être dues simplement à des différences d'état physique ou, si l'on veut, de grosseur micellaire. L'endotryptase fait disparaître d'abord les points de coagulation les plus bas, parce qu'elle commence par modifier l'état des particules d'albumine avant de procéder à des ruptures profondes de l'édifice moléculaire. Cette modification se traduirait donc par une élévation du point de coagulation. Il n'y a rien de surprenant, étant données les conditions dans lesquelles est obtenue cette albumine de levure, qu'elle renferme toujours un mélange de particules à divers états d'agrégation ; les diastases cellulaires, en effet, agissent sur elle à partir du moment où la cellule rompue est mise en contact avec l'eau de la macération (1).

Nous connaissons d'ailleurs un cas assez analogue : la leucosine du blé, qui est également une albumine, donne des solutions qui se troublent entre 48° et 50° et laissent séparer un coagulum à 52°. Le liquide chauffé jusqu'à 65° montre une nouvelle coagulation avec précipité se séparant à 73° jusqu'à la température de 82° (2).

Il est intéressant de rapprocher des données qui viennent d'être signalées les faits relatifs à la température mortelle de la levure. Les déterminations de E. Kayser (3) dont la précision est indiscutable, montrent que cette température mortelle, pour les levures à l'état humide, est d'environ 55°, certaines levures périssant entre 50° et 55°, d'autres seulement à 65°. D'autre part, la fermentation cesse à peu près de se produire à partir de 40° ; en élevant lentement la température, on peut cependant l'observer encore, quoique faiblement jusqu'à 45°.

La fermentation cesse donc lorsque la coagulation des albumines du protoplasma commence ; mais la mort n'arrive que si la température s'élève jusqu'à 55°, sans doute parce que la

(1) Je signalerai, à propos des températures de coagulation, que Henry et Auld, avec le suc de presse, ont obtenu des températures différentes de celles de Wroblewski : pour eux, la coagulation commence seulement à 48°, puis a lieu à 55°, 58° et 66° (*Proc. Royal Society*, 1905, **76**, série B, p. 568). En opérant avec le suc de macération de Lebedew, j'ai obtenu la même série de températures que Wroblewski.

(2) Osborne, *The vegetable Proteins*, London, 1916, p. 45.

(3) E. Kayser. Ces *Annales*, 1889, **3**, p. 513.

coagulation n'est définitive qu'à partir de ce point : en dessous de cette température, la cellule est encore capable de modifier l'état d'agrégation de ses protéines, créé artificiellement par le chauffage, pour le ramener au point qui lui convient.

*
* *

Passons maintenant à l'étude de la composition élémentaire de la protéine coagulable.

Dosage de l'azote. — Il a été fait comme précédemment par la méthode de Kjeldahl.

I.	0 gr. 205 de substance exigent	12 c.c. 0	SO^4H^2 n/5, soit	16,39	p. 10 N.
II.	0 gr. 189 —	—	11 c.c. 0	—	16,29 —

Dosage du soufre. — La substance est traitée par l'acide nitrique bouillant, la masse neutralisée par le carbonate de sodium, etc., comme plus haut.

I.	1 gr. 0065 de substance donnent	0 gr. 069	$BaSO^4$, soit	0,94	p. 100 S.
II.	1 gr. 205 —	—	0 gr. 078	—	0,888 —

Dosage du phosphore. — Un poids de 0 gr. 4155 de substance, fondu avec un mélange de carbonate et de nitrate alcalins, a donné par précipitation un dépôt à peine sensible de phosphate ammoniaco-magnésien impossible à peser.

Un second échantillon, pesant 2 gr. 470, est traité par l'acide nitrique bouillant; après neutralisation par le carbonate de sodium, on évapore, on chauffe au rouge, on reprend par l'acide nitrique étendu et on filtre. Le charbon étant détruit et les liqueurs réunies évaporées à environ 100 cent. cubes, on ajoute 60 cent. cubes de solution de nitrate d'ammonium à 34 p. 100 et 6 cent. cubes d'acide nitrique pur. On chauffe et on précipite par 200 cent. cubes de molybdate d'ammonium à 3 p. 100. Le précipité jaune recueilli et lavé est dissous dans un excès d'ammoniaque; on neutralise par l'acide chlorhydrique, on ajoute 1 gramme d'acide citrique et 5 cent. cubes de solution de chlorure de magnésium à 10 p. 100 puis un excès d'ammoniaque. Le liquide ne se trouble qu'après un certain temps d'agitation. Après 24 heures, le précipité est

recueilli et donne 0 gr. 0061 de pyrophosphate de magnésium correspondant à 0,069 p. 100 de phosphore.

Cette quantité reste très minime et la teneur certainement plus faible encore du premier échantillon analysé laisse supposer que le phosphore ne s'y trouve que d'une façon accidentelle; sa présence ne doit être attribuée qu'aux difficultés d'une purification complète du produit soumis à l'analyse.

Dosage des cendres. — Le produit a été incinéré au four à moufle à une température voisine du rouge naissant.

I.	1 gr. 9455	de substance	donnent	0 gr. 0070	de cendres, soit	0,55 p. 100
II.	1 gr. 3880	—	—	0 gr. 0041	—	0,29 —

Les cendres sont alcalines et contiennent des carbonates alcalins.

L'albumine de levure donne les réactions de précipitation des protéiques, en particulier avec les réactifs alcaloïdiques et les acides minéraux, y compris l'acide métaphosphorique. Ce dernier paraît donner une combinaison définie contenant près de 3 p. 100 de phosphore, analogue aux combinaisons du même genre étudiées par E. Fuld (1).

Cette protéine donne également les réactions colorées usuelles : biuret, Millon, xanthoprotéique, avec intensité. La réaction glyoxylique est particulièrement intense. Celle de Liebermann se produit facilement en rouge violacé et celle de Molisch en rouge brun. Enfin, la réaction du soufre est nettement positive.

Il s'agit donc bien d'une substance du groupe des albumines. Sa présence en quantité importante dans la levure présente un grand intérêt. Par analogie avec les appellations utilisées actuellement pour les protéines végétales, je propose de désigner ce corps sous le nom de *cérévisine* (de *Sacch. cerevisiæ*, nom donné à la levure de bière par Meyen et Reess).

Origine des protéiques de la levure.

Avant de continuer l'étude de ces protéiques, il est nécessaire de savoir d'où ils proviennent et s'ils peuvent être regardés

(1) E. Fuld. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 155.

comme des constituants normaux du protoplasma de la levure. En effet, ces substances sont extraites dans des conditions qui les exposent à être altérées par l'action des ferments autolytiques et en particulier de l'endotryptase.

Examinons point par point la méthode de préparation. La levure est d'abord lavée et elle perd dans ces conditions une partie de ses matériaux azotés solubles, comme en témoigne la diminution bien connue de sa teneur en azote total. Mais ce processus ne va pas jusqu'à l'épuisement complet, jusqu'à la mort de la cellule, qui reste parfaitement capable de vivre et de se reproduire après ce lavage : son protoplasma, dans ses constituants essentiels, n'est donc pas altéré. Le séchage, qui suit le lavage et l'expression à la presse, agit beaucoup plus énergiquement sur la levure. En effet, après dessiccation dans les conditions indiquées par Lebedew, on trouve un grand nombre de cellules dont l'enveloppe s'est rompue, comme l'ont constaté Beijerinck et van Hest (1). La macération qui intervient ensuite n'augmente pas le nombre de ces cellules ouvertes, d'après les mêmes auteurs; mais cette macération a pour effet de mélanger à l'eau le protoplasma ainsi mis en contact avec le dissolvant. Dans ces conditions, on pouvait penser que les processus autolytiques, se produisant avec énergie, viennent simplifier, solubiliser les constituants protoplasmiques, de sorte que les protéiques présents dans la macération et que j'ai isolés ne seraient que des produits d'autolyse et n'auraient aucune existence réelle dans la cellule.

La méthode de Lebedew pour l'extraction d'un suc de levure riche à la fois en protéiques et en zymase présente l'avantage d'une simplicité et d'une commodité remarquables, en même temps qu'elle nécessite seulement un matériel d'usage courant et peu coûteux. Diffère-t-elle profondément, quant à ses résultats, de celle de Buchner-Hahn? Il ne le semble pas si on se reporte au travail cité plus haut de Beijerinck et van Hest. D'après ces auteurs, la levure préparée selon la méthode de Lebedew, c'est à dire lavée et séchée, renferme un grand nombre de cellules déchirées et l'activité du suc obtenu est proportionnelle au nombre de cellules dont la paroi est rompue,

(1) Beijerinck et van Hest. *Folia microbiologica*, 1916, 4, p. 107.

comme dans la méthode de Buchner-Hahn. Par conséquent, dans les deux cas, il s'agit de produire la rupture de la paroi cellulaire : Lebedew extrait ensuite le suc par macération aqueuse, tandis que Buchner et Hahn emploient l'expression. Les sucs de levure obtenus par les deux méthodes sont comparables et les résultats trouvés pour l'un valent pour l'autre. Or, Geret et Hahn (1) font remarquer que l'autolyse n'agit presque pas sur le suc concentré et que celui-ci ne se modifie presque plus s'il est évaporé dans le vide au tiers de son volume. D'autre part, l'endotryptase est fortement gênée par la neutralisation du liquide et n'agit plus en milieu alcalin.

Dans les macérations en milieu alcalinisé par le carbonate de sodium, telles que je les ai employées, il ne peut donc guère se produire d'attaque des protéiques présents dans la cellule. Il est par suite extrêmement probable que la zymocaséine est une phosphoprotéine existant dans le protoplasma et non un produit d'altération.

Lorsque ce corps a été précipité par l'acide acétique, l'endotryptase se trouve dans des conditions très favorables pour agir sur l'albumine restée en solution; aussi convient-il, comme je l'ai indiqué, d'opérer rapidement et de porter aussitôt à l'ébullition pour détruire la diastase protéolytique et coaguler la cérévisine. On peut en somme, jusqu'à preuve du contraire, admettre également que cette dernière existe dans la cellule de levure.

Néanmoins, me rappelant que Buchner a tenté de préparer le suc de levure par congélation de celle-ci avec la neige carbonique et broyage au mortier, j'ai essayé d'obtenir par ce procédé un suc riche en protéiques. Dans ce but, j'ai utilisé l'air liquide (2).

On introduisait dans un grand mortier 100 grammes de levure pressée du commerce de préparation récente ; l'introduction avait lieu par portions assez petites, qui étaient aussitôt congelées avec de l'air liquide et triturées énergiquement. On continuait de faire arriver l'air liquide, par toutes petites fractions, la trituration étant poursuivie pendant vingt minutes. La poudre obtenue était abandonnée à un réchauffement progressif; lorsqu'elle com-

(1) Geret et Hahn. *Ber. der deutsch. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 2335.

(2) Buchner avait d'abord employé l'air liquide; il y a renoncé par la suite, l'évaporation de ce liquide pouvant laisser un résidu d'oxygène avec lequel des explosions sont possibles (*Die Zymasegährung*, p. 67).

mençait à devenir pâteuse, on la délayait dans 20 cent. cubes d'eau refroidie à 1-2°, et on essorait vivement dans un entonnoir de Buchner bien refroidi garni d'un disque de papier Chardin, le liquide étant recueilli dans un vase entouré de glace pilée. Après environ quarante minutes, on a recueilli 30 cent. cubes d'un liquide jaune clair, visqueux, opalescent, qui coagule en masse par chauffage à l'ébullition.

Ce liquide précipite par addition ménagée d'acide acétique; le précipité recueilli en quelques minutes par la centrifugation présente tous les caractères de la zymocaséine. D'autre part, deux portions du liquide obtenu, additionnées, l'une de présure, l'autre de papayotine, dans les conditions de l'expérience déjà rapportée, donnent un coagulum abondant après deux heures de séjour à 38°.

Le liquide clair obtenu après centrifugation du précipité acétique commence à se troubler dès qu'on le chauffe à 39-40°; à 41°, il se forme un précipité très apparent. Après filtration, le liquide coagule de nouveau à 50°. Chauffé à l'ébullition, il donne un coagulum abondant identique à l'albumine de levure ou cérévisine isolée des macérations.

Comme on le voit, la zymocaséine et la cérévisine existent dans le suc de levure préparé par congélation et mis à l'abri des transformations autolytiques; on est donc en droit d'admettre que ces substances préexistent dans la levure vivante.

Est-il possible de préciser davantage et d'attribuer à chacune de ces substances une signification physiologique déterminée? Pour la cérévisine, il est bien probable que cette albumine représente un constituant important du protoplasma proprement dit des cellules de levure. Quant à la zymocaséine, est-elle aussi un constituant normal du protoplasma ou s'agit-il d'une substance de réserve pouvant disparaître ou augmenter suivant les conditions de la nutrition?

D'après les idées de Pfeffer, on pourrait admettre la première hypothèse. Pour ce physiologiste, en effet, « les corps plastiques qui semblent jouer, en général, un rôle prépondérant dans la constitution du cytoplaste doivent être regardés comme des nucléines pauvres en acide phosphorique (1). Il nous faut évidemment rectifier cette dernière assertion : les corps dont il s'agit sont des phosphoprotéines, comme ces substances

(1) W. Pfeffer. *Physiologie végétale*, trad. Friedel, 1905, **1**, p. 56.

signalées par divers auteurs et rangées par eux à côté de la vitelline (ainsi par exemple, Reinke (1), dans son analyse du plasmode d'*Aethalium septicum*, y indique la présence de 5 p. 100 de vitelline).

La zymocaséine peut aussi n'être qu'un produit de réserve accumulé par la cellule. On sait que la levure renferme des inclusions ou corpuscules métachromatiques analogues à ceux qui ont été trouvés par Babes (2) dans le bacille diphtérique et aussi aux grains rouges de Butschli. Guilliermond, qui a surtout attiré l'attention sur les corpuscules métachromatiques de la levure (3), les regarde comme des substances de réserve. Je me suis demandé si la zymocaséine ne provenait pas de ces inclusions. Leur nature chimique ne paraît pas en effet bien déterminée : dans son travail de 1902, Guilliermond incline à penser qu'il ne s'agit pas de protéiques, parce que le réactif de Millon ne les colore pas. Plus tard, il est cependant amené à affirmer leur nature de corps azotés (4), se basant sur les travaux de A. Meyer (5) et de Kohl (6). Ces auteurs les considèrent comme des dérivés de l'acide nucléique, mais comme le fait avec juste raison remarquer Guilliermond, ce n'est là qu'une simple hypothèse qui attend une démonstration formelle.

Le caractère le plus net des corpuscules métachromatiques est de donner après fixation une coloration élective avec le bleu de méthylène et le bleu de toluidine ; la teinte obtenue varie du rouge au violet. Avec l'hématoxyline ou l'hématéine, ils donnent une coloration d'un rouge vineux.

Ils se colorent par la fuchsine de Ziehl et la coloration ne disparaît pas sous l'action de l'acide sulfurique à 1 p. 100 ; ce même réactif n'a pas non plus d'action sur la coloration donnée par le bleu de méthylène (7).

J'ai essayé de reproduire ces colorations sur la zymocaséine, étalée en couche mince sur lame et fixée au formol. Dans ces

(1) Reinke. *Unters. a. d. bot. Laborat. in Gœttingen*, 1881, **2**, p. 54.
(2) Babes. *Zeitsch. f. Hygiene*, 1888, **5**; 1895, **20**, p. 412.
(3) Guilliermond, *Thèse* de Paris et Lyon, 1902.
(4) Guilliermond. *Les levures* (Enc. scientif.), Paris, 1912, p. 76.
(5) A. Meyer. *Botan. Zeitung*, 1904, **62**, p. 143.
(6) Kohl. *Die Hefepilze*, Leipzig, 1908.
(7) Guilliermond et Mawas. *C. R. Soc. de Biol.*, **64**, p, 307; Guilliermond et Beauverie. *Ibid.*, 1908, p. 482.

conditions, le bleu de méthylène donne une teinte bleue, à peine mélangée de violet; le bleu de toluidine, du violet bleu, sans tendance marquée vers le rouge. Comme colorant hématoxylique, j'ai employé l'hémalun acide d'Ehrlich, qui m'a donné une teinte rouge vineux en milieu acide, virant au violet rougeâtre par passage dans l'eau calcaire.

La fuchsine de Ziehl colore intensément en rouge, et la teinte ne disparaît pas par l'acide sulfurique à 1 p. 100. Ce dernier atténue la couleur bleue produite par le bleu de méthylène, mais sans la faire disparaître.

Il est évidemment impossible de tirer une conclusion ferme de ces résultats, mais il faut bien remarquer qu'ils n'excluent pas l'hypothèse émise. La question appelle de nouvelles recherches. A noter que la cérévisine, soumise comparativement aux mêmes essais de coloration, se comporte comme une substance protoplasmique ; elle prend avec les bleus une très légère teinte bleutée, et ne se colore pas avec l'hémalun. La zymocaséine, au contraire, absorbe énergiquement les colorants dits basiques.

Autres essais de séparation des protéiques de la levure.

Schroeder a indiqué que la levure plasmolysée par l'éther donne un suc assez riche en protéiques. J'ai essayé de préparer par ce procédé les protéiques de levure. Dans ce but, 100 grammes de levure pressée ont été arrosés avec 10 cent. cubes d'éther pur et délayés dans une éprouvette à pied. La liquéfaction est très rapide. On abandonne pendant vingt-quatre heures à la température ordinaire, puis on laisse quarante-huit heures à la glacière en présence de 800 cent. cubes d'eau thymolée. Le liquide filtré ne donne aucune coagulation par chauffage.

L'expérience est recommencée, mais après vingt-quatre heures à la température ordinaire on ajoute 500 cent. cubes d'eau thymolée, on laisse à la glacière jusqu'au lendemain, on décante et on filtre. Le liquide filtré, coloré en jaune pâle, donne un précipité par l'acide acétique; après séparation de ce précipité, on obtient par chauffage un coagulum assez faible.

Les produits isolés sont identiques à la zymocaséine et à la

cérévisine, mais les rendements sont de beaucoup inférieurs à ceux que j'ai indiqués plus haut (1).

Van Laer a signalé depuis longtemps la liquéfaction de la levure en présence de sel marin (2). J'ai essayé des mélanges de levure pressée avec du chlorure de sodium en poudre fine, dans la proportion de 2,5 p. 100, 1,5 p. 100 et 1 p. 100 ; la liquéfaction est rapide et le mélange mousse abondamment par suite de la fermentation du glycogène. Après liquéfaction totale, on ajoute de l'eau et on laisse macérer pendant vingt-quatre heures, puis on filtre. Le liquide ne donne pas de coagulation par chauffage.

L'autolyse est donc assez rapide dans ces conditions pour détruire les protéiques qui pourraient passer en solution. J'ai songé à utiliser les propriétés antiprotéolytiques de la résorcine, signalées par Palladin (3) et, pour cela, j'ai liquéfié 100 grammes de levure pressée au moyen de 5 grammes de chlorure de sodium pulvérisé mélangé avec 2 grammes de résorcine. La liquéfaction se produit aussitôt. Après séjour de vingt-quatre heures à la glacière, la masse est délayée dans 500 cent. cubes d'eau ; on laisse déposer, on filtre. Le liquide clair ne se trouble ni par addition d'acide acétique, ni par chauffage à l'ébullition.

Une série d'expériences analogues, qu'il est inutile de rapporter en détail, dans lesquelles les conditions de durée, de concentration et de température ont été variées, n'a également donné aucun résultat.

J'ai alors essayé d'utiliser le pouvoir dissolvant de l'urée pour amener le passage des protéiques à travers la membrane de la levure. Des mélanges de 20 grammes de levure pressée avec 50 cent. cubes de solutions d'urée respectivement à 1 p. 100, 5 p. 100 et 10 p. 100 ont été préparés et abandonnés pendant quinze heures à la température ordinaire (17°). Par filtration, on obtient un liquide clair, devenant louche par chauffage à l'ébullition ; ce louche s'accentue par addition de quelques gouttes d'acide trichloracétique.

(1) Je ferai observer que Schrœder n'a pas cherché à séparer les substances contenues dans la macération qu'il obtient ; il utilise uniquement le produit global.

(2) Van Laer. *Chem. Centralbl.*, 1901, **1**, p. 352.

(3) Palladin. *Bioch. Zeitsch.*, 1912, **44**, p. 318.

L'expérience est recommencée avec les mêmes quantités d'urée, mais les macérations sont placées à l'étuve à 35° pendant seize heures. Le liquide obtenu par filtration du mélange contenant 1 p. 100 d'urée précipite légèrement par ébullition. Comme on le voit, les résultats sont assez peu encourageants; la quantité d'urée nécessaire rendrait au surplus le procédé coûteux et inapplicable.

J'ajouterai que si on mélange directement de la levure pressée avec 1 p. 100 de son poids d'urée pulvérisée, il y a liquéfaction très rapide. Au bout d'une heure, la masse additionnée d'eau et filtrée donne un liquide opalescent qui ne fournit aucun précipité, ni par l'acide acétique, ni par chauffage.

Il est vraisemblable que dans toutes ces expériences de plasmolyse les protéiques restent dans l'intérieur de la cellule; il passe seulement à l'extérieur des composés azotés plus simples, résultant peut-être d'une exagération des processus autolytiques à l'intérieur de la membrane. Ces composés azotés appartiennent presque tous au groupe des acides aminés, soit mono-aminés, soit diaminés.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA ZYMOCASÉINE ET DE LA CÉRÉVISINE

Les seules données qu'il soit possible de se procurer sur la constitution des protéiques extraits de la levure nous seront fournies par l'hydrolyse de ces produits. J'ai eu recours d'abord à l'hydrolyse acide.

Répartition de l'azote.

Pour étudier en premier lieu la répartition de l'azote dans la molécule, j'ai utilisé la méthode décrite par Hausmann (1). Elle consiste, en principe, à hydrolyser le protéique en expérience par ébullition avec un acide, neutraliser, doser l'ammo-

(1) Hausmann. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1899, **27**, p. 95; 1900, **29**, 136.

niaque formée, puis séparer les acides aminés en deux groupes au moyen de l'acide phosphotungstique.

Voici le mode opératoire suivi, qui correspond à peu près à celui indiqué par Osborne et Harris (1) :

On prend environ 1 gramme de substance, préalablement séchée jusqu'à poids constant et pesée exactement et on fait bouillir pendant huit heures au réfrigérant ascendant avec 20 cent. cubes d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide évaporé au bain-marie au tiers de son volume est neutralisé au moyen de magnésie pure calcinée ; on ajoute un excès de magnésie et on distille, afin de déplacer l'ammoniaque qui est titrée au fur et à mesure de son dégagement.

Le résidu, additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide, est concentré au bain-marie; on sépare par filtration les substances humiques insolubles dans lesquelles on dose l'azote par la méthode de Kjeldahl, et le liquide filtré, amené au volume de 100 cent. cubes, est additionné de 5 cent. cubes d'acide sulfurique, puis précipité par un léger excès d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100 dans l'acide sulfurique à 5 p. 100. Après vingt-quatre heures, on filtre, on lave avec une solution sulfurique étendue d'acide phosphotungstique, et on dose dans le précipité l'azote basique, attribuable surtout aux acides diaminés. Un dosage fait dans le liquide résiduel donne l'azote des acides mono-aminés et permet le contrôle de l'opération entière.

L'opération faite dans ces conditions donne des résultats assez comparables ainsi qu'il est facile de s'en rendre compte en pratiquant deux déterminations successives.

1° Zymocaséine. — On utilise deux échantillons séchés dans le vide sulfurique, pulvérisés et rendus bien homogènes. On sèche environ 2 grammes de chacun à 110° et on pèse deux fractions I et II. On a les résultats suivants :

	I	II
	gr.	gr.
Poids de substance	0,958	0,943
Trouvé azote ammoniacal	0,01064	0,0105
Correspondant en p. 100 à	1,11	1,11
Trouvé azote des substances humiques	0,00623	0,00392
Correspondant en p. 100 à	0,65	0,41
Trouvé azote du précipité phosphotungstique	0,0413	0,0396
Soit en azote diaminé p. 100	4,31	4,20
Trouvé azote du liquide résiduel	0,0935	0,0917
Soit en azote mono-aminé p. 100	9,76	9,72

(1) Osborne et Harris. *Journ. of amer. Chem. Society*, 1903, **25**, p. 323.

Il est intéressant de grouper ces chiffres en un tableau en les rapprochant de ceux qui ont été obtenus par Osborne pour la caséine (1), à l'aide d'une méthode analogue :

	ZYMOCASÉINE I		ZYMOCASÉINE II		CASÉINE DU LAIT	
	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote
Azote ammoniacal	1,11	6,86	1,11	6,89	1,61	10,30
— humique	0,65	4,02	0,41	2,54	0,21	1,30
— diaminé ou basique .	4,31	26,67	4,20	26,07	3,49	22,40
— mono-aminé	9,76	60,39	9,72	60,33	10,31	66,00
— total déterminé. . . .	15,83	97,94	15,44	95,83	15,62	100,00
Au lieu de	16,16	100,00	16,11	100,00		

Comme on le voit, la différence porte surtout sur l'ammoniaque, qui est produite en plus grande quantité dans l'hydrolyse de la caséine du lait. Néanmoins, il y a une concordance assez satisfaisante : tout au plus peut-on remarquer que la caséine du lait fournit un peu moins d'azote basique que celle de la levure.

2° Cérévisine. — Les échantillons employés provenaient de coagulums obtenus à l'ébullition, séchés à 110° et pulvérisés finement. On les débarrasse des matières étrangères solubles par épuisements répétés à l'eau bouillante. Après dessiccation à 110°, on pèse deux fractions qui sont soumises à l'hydrolyse. On a :

	I	II
	gr.	gr.
Poids de substance	1,064	1,5305
Trouvé azote ammoniacal.	0,01022	0,01456
Correspondant en p. 100 à	0,96	0,95
Trouvé azote des substances humiques. . . .	0,00294	0,00392
Correspondant en p. 100 à.	0,276	0,256

(1) Osborne. *The vegetable Proteins*, London, 1916, p. 57.

	I	II
Trouvé azote du précipité phosphotungstique.	0,0412	0,0598
Soit en azote diaminé p. 100	3,86	3,91
Trouvé azote du liquide restant	0,1162	0,1691
Soit en azote mono-aminé	10,90	11,05

En calculant ces résultats en p. 100 de l'azote total, je les mettrai en regard de ceux qui ont été trouvés par Osborne (*loc. cit.*) pour une albumine végétale, la léguméline des pois :

	CÉRÉVISINE I		CÉRÉVISINE II		LÉGUMÉLINE DE POIS	
	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote	p. 100 de substance	p. 100 d'azote
Azote ammoniacal	0,96	5,89	0,95	5,79	1,04	6,40
— humique	0,276	1,69	0,256	1,56	0,38	1,80
— diaminé ou basique.	3,86	23,69	3,91	23,73	3,45	23,90
— mono-aminé	10,92	67,03	11,05	67,42	11,33	67,90
— total déterminé . . .	16,016	98,30	16,166	98,50	16,20	100,00
Au lieu de	16,29	100,00	16,39	100,00		

La concordance est très remarquable, bien qu'il s'agisse de deux substances d'origine aussi différente : elles appartiennent toutes deux au groupe encore très restreint des albumines végétales typiques, solubles dans l'eau et coagulables par la chaleur.

Nature de l'azote basique.

Les deux substances étudiées contiennent une quantité assez élevée d'azote sous forme d'azote basique et il m'a paru intéressant d'en étudier la nature de plus près. Nous possédons, en effet, dans la méthode décrite en 1900 par Kossel et Kutscher (1) et devenue classique un procédé qui dépasse de beaucoup, au point de vue de la précision des résultats, la méthode de

(1) KOSSEL et KUTSCHER. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1900, **31**, p. 165.

E. Fischer pour la séparation et le dosage des acides monoaminés (1). En d'autres termes, il apparaît comme plus facile de caractériser les deux nouveaux protéiques par la détermination des quantités d'arginine, d'histidine et de lysine qu'ils fournissent à l'hydrolyse que par celle des acides aminés obtenue au moyen de la distillation fractionnée de leurs éthers.

La recherche a été faite en suivant exactement les données du mémoire de Kossel et Kutscher : hydrolyse sulfurique, précipitation par la baryte, enlèvement de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques et de la lysine sous forme de phosphotungstate que l'on transforme ultérieurement en picrate. Pour la séparation de l'histidine et de l'arginine, j'ai utilisé la modification de Kossel et Pringle (2) qui repose sur l'emploi du carbonate de baryum.

1° Hydrolyse de la zymocaséine. — L'opération a porté sur 60 grammes de produit séché dans le vide à 37°, qui correspondaient à 54 grammes de substance séchée à 110° jusqu'à poids constant. L'hydrolyse a été obtenue par chauffage de huit heures avec un mélange de 180 grammes d'acide sulfurique à 66° B. et 360 grammes d'eau.

Le liquide amené au volume de 600 cent. cubes ne réduit pas la liqueur de Fehling. Un dosage d'azote indique une teneur de 8 gr. 232, soit seulement 15,24 p. 100. Après saturation presque complète de l'acide au moyen d'hydrate de baryum pulvérisé, on essore et on épuise le sulfate de baryum par l'eau bouillante. La totalité du liquide est évaporée à 500 cent. cubes ; un dosage d'azote ne donne que 7 gr. 469, soit une perte de 0 gr. 763, correspondant à 9,26 p. 100 d'azote humique entraîné par le précipité barytique.

Le dosage de l'ammoniaque, par distillation sur un léger excès de magnésie, donne 3,97 p. 100 de l'azote total sous forme d'azote ammoniacal, soit 0,605 p. 100 du protéique, Le liquide débarrassé d'ammoniaque par la magnésie, de magnésie par la baryte et de la baryte en excès par l'acide sulfurique est additionné à chaud de sulfate d'argent jusqu'à léger excès, on refroidit, on précipite par la baryte, on filtre et on essore le précipité d'arginine et d'histidine argentiques. Ce précipité décomposé donne les bases en solution; on amène le volume à 500 cent. cubes et on dose l'azote. On trouve 2 gr. 1224, soit 25,78 p. 100 de l'azote total.

L'histidine est séparée au moyen du carbonate de baryum ; le précipité est décomposé et l'azote dosé dans la solution. Trouvé : 0 gr. 3858 d'azote, soit 4,68 p. 100 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 424 d'histidine ou

(1) E. Fischer. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **33**, p. 151. V. aussi *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*, Berlin, 1906.
(2) Kossel et Pringle. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1906, **49**, p. 318.

2,63 p. 100 de zymocaséine. J'ai pu extraire à l'état de dichlorhydrate 0 gr. 998 d'histidine, ce qui correspond seulement à 1,85 p. 100.

L'arginine argentique étant précipitée par un excès de baryte est décomposée ultérieurement : la solution contient 0 gr. 623 d'azote, soit 7,56 p. 100 de l'azote total, correspondant à 1 gr. 936 d'arginine ou à 3,58 d'arginine p. 100 de zymocaséine. La quantité d'arginine isolée en fait sous forme de nitrate était seulement de 1 gr. 35, soit 2,50 p. 100 seulement.

Le liquide dont on a précipité l'histidine et l'arginine est débarrassé d'argent ; un dosage d'azote y indique 4 gr. 648 d'azote, soit 56,46 p. 100 de l'azote total. On précipite par l'acide phosphotungstique ; le précipité lavé est décomposé par la baryte et l'azote dosé. On trouve 1 gr. 0396 d'azote, 12,63 p. 100 de l'azote total.

Le liquide restant, contenant les acides mono-aminés, doit donc renfermer 56,46 — 12,63 = 43,83 p. 100 de l'azote total. Si le précipité phosphotungstique ne contenait que la lysine, il y aurait de celle-ci environ 10 p. 100 de la zymocaséine. La transformation en picrate étant effectuée, on obtient seulement 5 gr. 672 de picrate cristallisé, correspondant à 2 gr. 208 de lysine ou 4,09 p. 100 de zymocaséine. Celle-ci ne représente donc que 5,14 p. 100 de l'azote total (1).

On voit qu'indépendamment de l'azote resté dans les précipités, il reste dans les liquides dont on a extrait l'histidine et l'arginine d'une part, la lysine d'autre part, des quantités importantes d'azote sous forme inconnue (2).

Néanmoins, ces résultats vont nous permettre d'établir une comparaison entre la zymocaséine et la caséine du lait, ainsi qu'avec la glutencaséine. On peut, en effet, en s'en tenant à la répartition de l'azote basique entre l'ammoniaque et les trois bases hexoniques de Kossel, obtenir le tableau suivant :

	Zymocaséine de levure	Caséinogène du lait (3)	Glutencaséine de blé (3)
Ammoniaque	0,73	2,0	4,0
Histidine	2,63	2,6	1,8
Arginine	3,58	4,8	4,7
Lysine	4,09	5,8	1,9

C'est donc surtout par la quantité d'ammoniaque fournie que les différences apparaissent. De plus, la zymocaséine se rap-

(1) Tous ces calculs ont été établis en tenant compte des quantités employées aux dosages ; ils sont toujours rapportés à la totalité de la substance soumise à l'hydrolyse. Les chiffres indiqués ne nécessitent par suite aucune correction.

(2) Cet azote est probablement sous forme d'acides monoaminés; on sait déjà que le liquide duquel a été isolée la lysine renferme une partie importante de la phénylalanine formée par hydrolyse, et précipitée en même temps par l'acide phosphotungstique.

(3) ABDERHALDEN. *Lehrbuch d. physiol. Chem.*, 1914, 3e édition, p. 400.

proche de la caséine du lait par sa teneur en lysine, tandis que la glutencaséine est beaucoup plus pauvre.

2° Hydrolyse de la cérévisine. — Cette hydrolyse a été effectuée en chauffant 58 gr. 6 de produit séché à 110° jusqu'à poids constant avec un mélange de 180 grammes d'acide sulfurique à 66° B. et 360 grammes d'eau, à l'ébullition, pendant huit heures.

Le liquide refroidi est amené à 500 cent. cubes; on dose l'azote sur 5 cent. cubes et on obtient 9 gr. 442 d'azote, soit 16,11 p. 100 de la cérévisine. Après saturation de l'acide par l'hydrate de baryte, essorage et lavage du précipité, il ne reste plus que 8 gr. 8536 d'azote, soit une perte de 0 gr. 5884 ou 6,22 p. 100 d'azote humique en p. 100 de l'azote total. Le dosage de l'ammoniaque donne une teneur de 3,43 p. 100 de l'azote total, correspondant à 0,55 d'azote ammoniacal p. 100 de protéique.

Après séparation de l'histidine et de l'arginine à l'état de combinaisons argentiques, on décompose le précipité et on dose l'azote dans la totalité de la solution obtenue : on trouve ainsi 1 gr. 774 d'azote, soit 18,78 p. 100 de l'azote total pour le précipité renfermant les deux bases. L'histidine argentique étant de nouveau séparée au moyen du carbonate de baryum, on la met en solution et on dose l'azote : on trouve 0 gr. 32 d'azote, soit 3,39 p. 100 de l'azote total. Ce chiffre correspond à 1 gr. 184 d'histidine, soit 2,02 p. 100 de protéine. La quantité d'histidine obtenue n'a été que de 0 gr. 87.

La combinaison argentique de l'arginine est précipitée, lavée et décomposée. On dose l'azote dans la solution et on obtient, pour la totalité, 0 gr. 7474 d'azote, soit 7,91 p. 100 de l'azote total, correspondant à 2 gr. 318 d'arginine, ou 3,95 p. 100 de protéine. La quantité d'arginine obtenue à l'état de nitrate cristallisé était de 1 gr. 95.

Le liquide dont on a séparé l'histidine et l'arginine étant débarrassé d'argent et soumis au dosage de l'azote, on trouve en tout 6 gr. 9733, soit 66,44 p. 100 de l'azote total. Le précipité phosphotungstique renferme 1 gr. 352 d'azote, soit 14,32 p. 100 de l'azote total. Il y a donc pour les acides monoaminés 66,44 — 14,32 = 52,12 p. 100 de l'azote total.

Ce précipité étant décomposé, on précipite la lysine à l'état de picrate. Ce sel recueilli et séché pèse 10 gr. 752, qui correspondent à 4 gr. 186 de lysine, soit 7,14 p. 100 de protéine. L'azote correspondant est 0 gr. 8028 ou 8,50 p. 100 de l'azote total.

On peut déduire de ces divers dosages que les quantités d'histinine et d'arginine obtenus après purification des combinaisons argentiques de ces deux bases sont notablement plus faibles que celles qui paraissaient devoir être présentes d'après le dosage de l'azote dans l'ensemble du précipité argentique.

J'ai essayé, dans une deuxième hydrolyse, d'améliorer les rendements et je suis arrivé aux chiffres suivants :

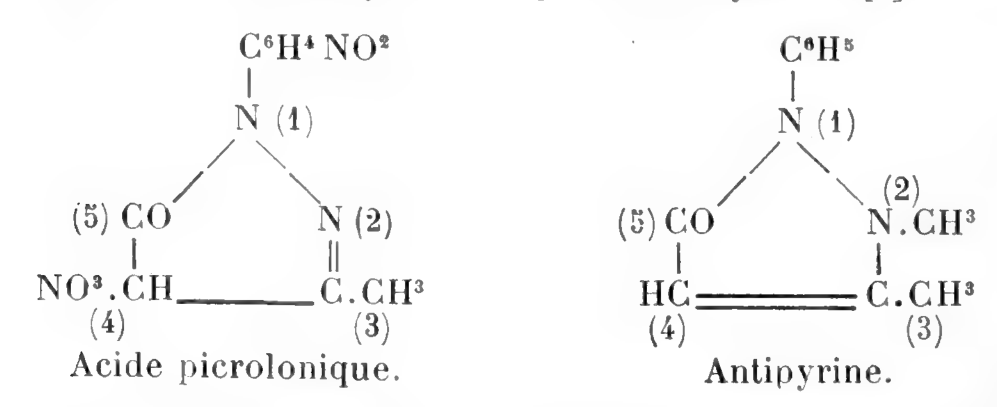
L'hydrolyse a porté sur 30 grammes de cérévisine, qui ont été chauffés pendant quatorze heures avec 90 grammes d'acide sulfurique et 180 grammes d'eau. J'ai obtenu, en azote ammoniacal, 2,634 p. 100 de l'azote total ou 0,424 p. 100 de substance. Par suite d'un accident, la fraction histidine a été perdue après sa séparation. Pour l'arginine, la combinaison argentique est décomposée, la liqueur débarrassée d'acide sulfurique par la baryte et de l'excès de baryte par un courant de gaz carbonique. On concentre, on filtre et le liquide évaporé à 10 cent. cubes environ est additionné d'un léger excès d'acide picrolonique (1) dissous dans l'alcool chaud. Après quelques instants, le liquide se trouble et il se dépose un abondant précipité cristallin jaune clair. On recueille après vingt heures, on lave, on sèche et on pèse. On obtient ainsi 3 gr. 45 de picrolonate d'arginine, correspondant à 1 gr. 37 d'arginine, soit 4,42 p. 100 de protéine. Quant à la lysine, on a obtenu 6 gr. 25 de picrate de cette base, correspondant à 2 gr. 43 de lysine, soit 8,10 p. 100 de protéine (2).

On peut maintenant comparer les résultats obtenus pour la cérévisine à ceux qui ont été publiés pour d'autres albumines végétales, comme par exemple la léguméline de pois. On trouve :

	Cérévisine	Léguméline (3)
	—	—
Ammoniaque	0,67	1,23
Histidine	2,02	2,27
Arginine	4,42	5,45
Lysine	8,10	3,03

Comme on le voit, la concordance dans les chiffres de répartition de l'azote obtenus par la méthode de Hausmann modifiée disparaît dès que l'on met en regard les quantités de chacune des bases elles-mêmes ou sans doute de chacun des acides aminés pris isolément.

(1) L'acide picrolonique, décrit par Bertram (*Dissertation*, Iéna, 1892), est le 1-paranitrophényl-3-méthyl-4-nitropyrazolone-5, $C^{10}H^{8}O^{5}N^{4}$. C'est une antipyrine dinitrée en paraphényl et en [4] et déméthylée en [2].



Acide picrolonique. Antipyrine.

(2) La plupart de ces résultats analytiques ont été publiés en collaboration avec Mme S. Kolodziejska. *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **157**, p. 243.
(3) OSBORNE. *The vegetable Proteins*, p. 59.

Si la léguméline est une protéine assez riche en arginine, on voit que la cérévisine est l'une des plus riches en lysine (1) qui soient connues. C'est là un caractère intéressant qui donne à cette albumine une place à part et suffit à la distinguer des autres protéines d'origine végétale.

*
* *

Il est instructif de comparer, au point de vue de la répartition de l'azote, les chiffres obtenus dans l'hydrolyse sulfurique de la zymocaséine et de la cérévisine avec ceux qui ont été donnés par la méthode de Hausmann. Ces chiffres sont en p. 100 de l'azote total.

	Zymocaséine		Cérévisine	
	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique	HAUSMANN	hydrolyse sulfurique
Azote ammoniacal	6,86	3,97	5,89	3,43
— humique	4,02	9,26	1,69	6,22
— du précipité argentique contenant arginine et histidine	»	25,78	»	18,78
— du précipité phosphotungstique	»	12,63	»	14,32
— de l'histidine	»	4,68	»	3,39
— de l'arginine	»	7,56	»	8,84
— de la lysine	»	5,14	»	9,64
— total des trois bases	26,67	17,38	23,69	21,87
— des acides monoaminés :				
directement	60,39	43,83	67,03	52,12
par différence	62,45	69,39	68,73	68,48

Il est facile de déduire de ce tableau un certain nombre de faits intéressants.

1° On voit que l'hydrolyse sulfurique produit moins d'ammoniaque et plus de substances humiques que l'hydrolyse chlorhydrique dans la méthode de Hausmann. Mais le total de l'azote ammoniacal et de l'azote humique ne change guère : 13,23 au lieu de 10,88 pour la zymocaséine, 9,65 au lieu de 7,58 pour la cérévisine. Ceci vient confirmer les faits signalés par Kossel

(1) D'après les résultats de Schrœder (*loc. cit.*), qui a extrait jusqu'à 8,68 p. 100 de lysine du mélange indéterminé, contenant vraisemblablement à la fois zymocaspine et cérévisine, qu'il a soumis à l'hydrolyse, la teneur de la cérévisine en lysine doit être encore plus élevée et comprise entre 9 et 10 p. 100, car celle de la zymocaséine ne paraît pas atteindre 5 p. 100.

6

et Kutscher (1) à propos de l'hydrolyse de la glutencaséine par l'acide sulfurique à 1/3 en volume ou 1/3 en poids, et par Udransky (2) au sujet de l'origine des substances humiques : celles-ci proviendraient surtout de l'action des acides sur les groupements susceptibles de fournir de l'ammoniaque par hydrolyse ;

2° La précipitation de l'histidine et de l'arginine au moyen des sels d'argent est accompagnée par celle de produits azotés inconnus en quantité assez élevée, et il n'y a pas concordance entre les deux méthodes : on ne peut donc considérer la somme de l'azote enlevé par le précipité argentique et de l'azote enlevé ensuite par la précipitation avec l'acide phosphotungstique comme représentant l'azote basique ;

3° Le précipité phosphotungstique qui contient la lysine renferme également d'autres corps (en particulier, comme on le sait maintenant, la phénylalanine). La détermination de l'azote basique dans la méthode de Hausmann conduit donc toujours à des résultats trop forts, et d'autant plus élevés qu'il y a plus de ces produits dans la molécule étudiée.

Nature des acides mono-aminés.

La recherche et la séparation des acides mono-aminés peuvent être faites par la méthode d'éthérification de E. Fischer, à condition de posséder une quantité assez importante de substance. J'ai dû, pour cette raison, renoncer momentanément à ce travail. Il ne faut d'ailleurs pas exagérer l'importance de cette lacune au point de vue du but poursuivi actuellement, qui est surtout de rechercher les caractéristiques les plus importantes des deux protéiques de la levure. La méthode d'éthérification, même entre des mains expertes, comporte des causes d'erreur assez importantes pour que les résultats qu'elle fournit aient beaucoup plus que la valeur d'indications sur les quantités des divers acides aminés présents dans la molécule (3).

Nous avons déjà, grâce au travail de Schrœder (*loc. cit.*), d'utiles renseignements sur certains de ces acides aminés.

(1) Kossel et Kutscher. *Loc. cit.*
(2) Udransky. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1888, **12**, p. 42.
(3) Abderhalden et Weil. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1911, **74**, p. 445; 1912, **77**, p. 59.

Ainsi, nous savons que le glycocolle n'existe pas dans les protéiques étudiés, que la phénylalanine, la tyrosine et la cystine ne peuvent s'y trouver qu'en très faible quantité. Il ne faut donc probablement pas compter sur ces corps pour nous fournir des caractères différentiels.

On en peut dire autant de la leucine; présente dans toutes les molécules des protéiques en quantité assez notable, sa détermination, d'ailleurs difficile à faire exactement, ne nous apprendrait pas grand'chose.

Celle des acides aspartique et glutamique semblerait devoir être plus profitable. Il en est de même du dosage du tryptophane, élément plus particulier, tant au point de vue de sa structure chimique qu'à celui de son importance physiologique, et dont la présence imprime à la molécule protéique un caractère beaucoup plus tranché.

Pour cette raison, je me suis proposé surtout de doser cet acide aminé dans les protéiques étudiés.

Dosage du tryptophane. — Les solutions de zymocaséine, aussi bien que celles de cérévisine, donnent par addition d'une solution d'acide glyoxylique, puis d'acide chlorhydrique concentré, un anneau d'un violet intense à la surface de séparation des deux couches : c'est la preuve que ces protéiques contiennent du tryptophane (1). En raison de l'intensité de la réaction obtenue, il est à prévoir que la quantité de cet acide aminé est assez notable.

Je rappellerai le mode opératoire employé par moi pour le dosage du tryptophane dans les protéiques, par la méthode colorimétrique déjà décrite (2) :

La substance desséchée est pulvérisée finement et tamisée à travers un tissu de soie serrée, puis la poudre est séchée à l'étuve jusqu'à poids constant. On pèse exactement un poids voisin de 0 gr. 40 de produit et on le dissout, en broyant au mortier, par petites portions, dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100. On complète ensuite à 200 cent. cubes avec cette solution. Certaines substances ne dissolvent pas complètement dans ces conditions. On prend alors une quantité convenable de préparation à l'état humide, soit coagulée par la chaleur, soit précipitée et lavée, et on l'essore avec soin. On prélève deux portions de même poids — environ

(1) Abderhalden. *Lehrbuch d. physiol. Chem.*, 1914, 3e édit., p. 380.
(2) P. Thomas. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1914, **1**, p. 67; ces *Annales*, 1920, **34**, p. 720.

2 grammes — de la masse humide et on dessèche l'une à l'étuve jusqu'à poids constant, tandis que l'autre est dissoute dans 200 cent. cubes de la solution de carbonate de sodium. On connaît ainsi le poids de matière sèche en solution.

La solution, additionnée de 0 gr. 10 d'une préparation active de pancréatine, puis de 5 cent. cubes de chloroforme et de 5 cent. cubes de toluène, est placée à l'étuve à 37° et abandonnée à cette température. On prélève après chaque période de vingt-quatre heures un volume déterminé de liquide que l'on essaie à l'eau de brome après neutralisation. Quand la coloration ne paraît plus augmenter d'intensité (cinq à sept jours) on prélève avec une pipette une certaine quantité de liquide que l'on filtre et on mesure 50 cent. cubes de filtrat auquel on ajoute 10 cent. cubes de réactif au p-diméthylaminobenzaldéhyde, puis assez d'acide chlorhydrique concentré et pur pour amener le volume à 100 cent. cubes. On mélange et on laisse à la lumière, en disposant à côté, soumis au même éclairement, un ballon semblable dans lequel on a mis avec le réactif et l'acide chlorhydrique 50 cent. cubes d'une solution de tryptophane pur (1) de richesse connue (0,004 à 0,010 p. 100). Après quarante à quarante-huit heures, on compare les teintes au colorimètre; on fait de nouveau cette comparaison après cinquante à soixante heures et on calcule la richesse en tryptophane.

En travaillant dans ces conditions, j'ai obtenu avec les protéiques de la levure les teneurs suivantes :

	I	II	III	Moyenne
Zymocaséine	1,64	1,40	1,50	1,51
Cérévisine	2,20	2,14	2,50	2,28

Comme on le voit, la zymocaséine de la levure, déjà si proche de la caséine du lait par d'autres caractères, s'en rapproche encore par sa teneur très voisine en tryptophane (1,5 p. 100).

Enfin la cérévisine, avec sa teneur de 2,3 p. 100 environ, est l'une des substances protéiques les plus riches en tryptophane qui soient connues ; cette richesse, jointe à la quantité élevée de lysine qu'elle donne à l'hydrolyse, suffit à la faire classer dans un groupe tout à fait à part.

Hydrolyse diastasique.

Les protéiques de la levure subissent facilement l'hydrolyse diastasique ; le suc de levure lui-même contient des protéases

(1) Le tryptophane qui a servi à ces comparaisons provenait de la maison Hoffmann La Roche, place des Vosges, à Paris.

Il est commode d'en préparer une solution à 0,02 p. 100, que l'on dilue plus ou moins au moment de l'expérience.

très actives, puisque, après quelques jours de conservation à l'étuve à 37°, il ne renferme plus d'albumine coagulable, ainsi que l'ont d'abord montré Geret et Hahn. Le tableau suivant, donné par ces auteurs, indique bien la marche de la digestion (1) :

	Extrait sec	Azote total	Poids de coagulum	Azote du coagulum	Azote du liquide
Suc frais . . .	12,12	1,45	5,99	0,93	0,52
Après 1 jour .	—	—	1,87	0,25	1,19
— 2 jours.	—	—	0,50	0,05	1,40
— 4 —	—	—	0,28	0,025	1,42
— 6 —	—	—	0,21	0,02	1,43

D'après eux, il s'agit d'une endotryptase qui serait accompagnée d'érepsine. Les recherches plus récentes de Dernby (2) ont montré dans le suc de levure la présence d'une peptase, d'une tryptase et d'une érepsine analogues à celles du tube digestif de l'homme. Les concentrations optima en ions hydrogène pour ces ferments sont : p_H = 4-4,5 pour la peptase, p_H = 7,0 pour la tryptase, p_H = 7,8 pour l'érepsine.

La présence d'érepsine explique pourquoi Hahn et Geret n'ont pu trouver de peptones dans le suc de levure autolysé. Après une digestion poursuivie pendant une heure seulement, à 37°, il n'existe que des traces d'albumoses, pas de peptones, et le liquide contient déjà de faibles quantités de leucine et de tyrosine. Si on fait une digestion ralentie à la glacière, à une température de 5°, on obtient au bout de quatorze jours 0 gr. 5 seulement de deutéroalbumose pour 100 cent. cubes de suc (3). La présence de peptone aurait été constatée par Wroblewski dans le suc de levure (4), probablement par erreur.

Ce sont évidemment ces mêmes ferments qui agissent dans l'autodigestion de la levure et qui donnent finalement toute une série d'acides aminés. Sans s'arrêter aux recherches anciennes de Béchamp (5), de Schutzenberger (6), de Nægeli et

(1) Geret et Hahn. *Die Zymasegährung*, p. 295.
(2) Dernby. *Bioch. Zeitsch.*, 1917, **81**, p. 107.
(3) Geret et Hahn. *Loc. cit.*, p. 307.
(4) Wroblewski. *Loc. cit.*
(5) Béchamp. *C. R. Acad. des Sciences*, 1865, **61**, p. 689 et suiv.
(6) Schutzenberger. *C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 493.

Lœw (1), de Salkowski (2), etc., il faut arriver aux travaux de Kutscher (3) qui donne une liste assez complète de ces acides aminés : acide aminobutyrique, leucine, tyrosine, acides aspartique et glutamique, histidine, arginine, lysine. On y trouve aussi de l'ammoniaque, de la choline et des bases puriques, guanine et adénine surtout, xanthine et hypoxanthine à l'état de traces. Ces dernières proviennent évidemment de l'action d'une nucléase.

J'ai essayé de produire l'hydrolyse diastasique des protéiques de levure, isolés et mis à l'abri des ferments autolytiques, au moyen de pepsine et de trypsine animales.

1° Zymocaséine. — Une solution de deux grammes de zymocaséine dans 100 cent. cubes de carbonate de sodium à 0,05 p. 100 est additionnée d'acide chlorhydrique étendu jusqu'à neutralisation ; on verse alors un excès d'acide, tel que la teneur en HCl réel soit de 0,3 p. 100, puis on ajoute 0 gr. 10 de pepsine active (4) et on place au bain-marie à 45°.

Après trente minutes, le précipité, devenu d'abord translucide, a presque disparu. Au bout de deux heures, on neutralise, on filtre et on examine les réactions du liquide. Celui-ci, acidulé par l'acide acétique, ne se trouble pas par chauffage à l'ébullition. Par addition ménagée d'acide nitrique, il donne un trouble qui disparaît par un léger chauffage et reparaît par refroidissement. Saturé avec du sulfate d'ammonium ou du sulfate de zinc en poudre fine, il donne un léger précipité blanc. Ce liquide contient donc des albumoses, mais en faible quantité.

La solution dont on a précipité les albumoses par le sulfate d'ammonium est filtrée et soumise à une dialyse rapide, afin d'enlever la majeure partie du sel dissous. Le liquide clair ne précipite plus par l'acide nitrique, mais donne avec l'alcool un précipité un peu visqueux ; avec le chlorure mercurique, il fournit un précipité blanc volumineux. Les réactions colorées présentent des intensités variables :

(1) Nægeli et Loew. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, **125**, p. 403.
(2) E. Salkowski. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1889, **13**, p. 506.
(3) Kutscher. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **32**, p. 59 et 419 ; 1902, **34**, p. 517. Kutscher et Lohmann. *Ibid.*, 1903, **39**, p. 159 et 313.
(4) Pepsine Armour, titrant 360 d'après l'essai du Codex.

Biuret.	Intense (rose violacé).
Xanthoprotéique . .	+ faible.
Millon	+ faible.
Hopkins	+ nette.
Liebermann	+ nette.

Il s'agit donc bien de peptone.

La solution de zymocaséine dans le carbonate de sodium, additionnée de 0 gr. 10 de trypsine commerciale (1) et soumise à la digestion au bain-marie à 45° devient tout à fait transparente et fluide au bout de peu de temps. Après deux à trois heures, le liquide ne précipite plus que faiblement par l'acide nitrique ; il montre les mêmes réactions que celui qui provient de la digestion pepsique.

2° Cérévisine. — J'ai employé le coagulum humide obtenu par chauffage de la solution acidifiée à l'ébullition et lavage à l'eau bouillante.

Cette masse humide a été délayée dans l'acide chlorhydrique étendu contenant 0,3 p. 100 d'acide réel et placée au bain-marie à 45° après addition de 0 gr. 10 de pepsine. Le coagulum se gonfle et en quelques instants la masse entière devient gélatineuse et transparente ; la liquéfaction se produit ensuite très rapidement. Au bout de deux heures, on peut constater dans le liquide filtré et neutralisé la présence d'albumoses et de peptones, avec peut-être une proportion d'albumose plus élevée que dans le cas de la zymocaséine.

Si on ajoute à ce liquide 10 p. 100 de suc de levure Lebedew et si on l'abandonne à l'étuve à 37° après addition de toluène et de chloroforme pour en assurer la stérilité, on voit que la réaction du biuret diminue très vite d'intensité ; elle a totalement disparu au bout de trois jours.

Le coagulum humide de cérévisine, délayé dans une solution de carbonate de sodium à 0,5 p. 100, additionné de 0 gr. 10 de trypsine et placé au bain-marie à 45°, se gonfle et se dissout très rapidement. Au bout de deux à trois heures, il montre également la présence d'albumoses et de peptones.

La cérévisine séchée à 110° et pulvérisée constitue une poudre formée de particules très dures et très résistantes ; aussi

(1) Trypsine très active, provenant de Merck.

ne se laisse-t-elle pas attaquer rapidement par les ferments digestifs. Il est nécessaire, si on emploie ce produit, de le pulvériser très finement et de tamiser la poudre obtenue, pour obtenir des digestions suffisamment avancées.

On voit en résumé qu'il est possible d'obtenir des peptones véritables avec les protéiques de la levure; c'est seulement la présence d'érepsine dans le suc de levure qui fait disparaître des peptones dans les produits d'autolyse.

QUATRIÈME PARTIE

UTILISATION DES PROTÉIQUES DE LA LEVURE

On a depuis longtemps songé à l'utilisation de la levure au point de vue alimentaire; il existe déjà dans le commerce un certain nombre de préparations, ayant surtout la forme d'extraits de viande, qui sont obtenus par divers procédés en partant de la levure.

Sans aborder la question de la nature de ces produits, en restant sur le terrain purement scientifique, on peut tirer des résultats qui ont été exposés précédemment des conclusions intéressantes au point de vue de l'utilisation des protéiques étudiés par l'organisme.

Nous devons admettre actuellement, d'après Rona (1), qu'il ne se produit dans l'organisme animal aucune transformation d'un acide aminé dans un autre, ni aucune nouvelle formation d'un acide aminé, à l'exception du glycocolle. Donc les acides aminés qui n'existent pas dans les protéiques des aliments ingérés ne se font pas dans l'organisme.

Ces acides aminés n'ont certainement pas tous la même importance, chacun pouvant jouer un rôle particulier. On entrevoit déjà ce rôle pour quelques-uns d'entre eux: on sait depuis longtemps que la gélatine, qui ne renferme ni phénylalanine, ni tyrosine, ni tryptophane, est incapable de maintenir, à elle seule, l'organisme en état d'équilibre azoté; il en est de même de la zéine, à laquelle manquent le glycocolle, la

(1) P. Rona. *Handbuch d. Bioch.* de Oppenheimer, Iéna 1908, **4**, 1re partie, p. 550.

lysine et le tryptophane. D'autre part, la gliadine du blé et l'hordéine de l'orge, auxquelles font défaut le glycocolle et la lysine, peuvent assurer le maintien de l'équilibre azoté chez l'individu adulte, mais elles ne suffisent pas pour permettre en même temps le développement de l'individu jeune, non encore arrivé au stade de développement complet. Au contraire, la caséine, la lactalbumine, l'ovalbumine, l'édestine, la gluténine (gluten-caséine), permettent aussi bien le maintien de l'équilibre que le développement (1).

Le rôle du tryptophane, en particulier, a été bien mis en évidence par Abderhalden (2). Cet auteur a prouvé qu'un animal peut être nourri complètement avec les produits d'hydrolyse des protéiques. En employant les acides aminés résultant de l'hydrolyse de la caséine, soit en entier, soit débarrassés de tryptophane, il a montré que ce dernier est un constituant indispensable à l'entretien de l'équilibre azoté et ne pouvant être remplacé.

Cette observation suggère l'idée qu'un aliment peu favorable, soit parce qu'il lui manque un ou plusieurs acides aminés indispensables, soit parce que les proportions en sont par trop différentes de celles des protéiques de notre propre organisme, peut être amélioré par addition d'un autre protéique contenant les substances qui font défaut ou rétablissant les rapports désirables entre les acides aminés. Des corps comme la zymocaséine et surtout la cérévisine, dont la richesse en lysine et en tryptophane est exceptionnelle, pourraient ainsi jouer un rôle considérable dans l'alimentation, surtout chez les individus en voie de développement, en étant simplement adjointes à des protéines végétales comme celles de l'orge ou du maïs, dans lesquelles il y a déficit de ces acides aminés indispensables. On conçoit facilement l'intérêt économique d'un pareil fait.

Je n'ai pu, faute de moyens suffisants, vérifier cette hypothèse si vraisemblable. Je me suis contenté, avec la quantité assez faible de cérévisine dont je disposais, de m'assurer que ce protéique permet de maintenir à lui seul l'équilibre azoté.

(1) Osborne et Mendel. Revue américaine *Science*, 1911, **24**, p. 722. Voir également divers travaux des mêmes, dans *Journ. of biol. Chem.*, 1911-1919, **10** et suivants, contenant la bibliographie.

(2) Abderhalden. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **77**, p. 22.

L'animal en expérience était un jeune chien, non encore parvenu peut-être à son complet développement, qui a reçu pendant quelques jours une ration, copiée sur celle des expériences d'Abderhalden, formée de 50 grammes de viande de cheval, 20 grammes de graisse, 20 grammes de glucose, 20 grammes d'amidon et 5 grammes de cendres d'os. L'équilibre étant à peu près obtenu après cinq jours, l'animal a reçu dans les jours suivants une ration identique, mais dans laquelle la viande était remplacée par 57 grammes de cérévisine coagulée humide. La quantité de boisson était identique pendant la durée de l'expérience (125 gr. d'eau)

Voici les chiffres obtenus :

Jours	Poids	Régime	Azote ingéré	Urine émise	Azote de l'urine	Poids des fèces	Azote des fèces	Azote éliminé	Bilan
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	kil.		gr.	c. c.	gr.	gr.	gr.	gr.	
1	3,260	viande de cheval 50 gr.	1,41	105	1,33	10,2	0,12	1,45	—0,04
2	3,270		—	120	1,38		0,12	1,50	—0,09
3	3,295		—	100	1,29		0,11	1,40	+0,01
4	3,300		—	90	1,27		0,11	1,38	+0,03
5	3,290		—	130	1,30	8,0	0,12	1,42	—0,01
6	3,305	cérévisine 57 gr.	1,43	100	1,28		0,12	1,40	+0,03
7	3,315		—	110	1,33		0,12	1,45	—0,02
8	3,320		—	120	1,36	11,4	0,14	1,50	—0,07
9	3,320		—	95	1,27		0,13	1,40	+0,03
10	3,310		—	115	1,38		0,14	1,52	—0,09
11	3,295		—	100	1,30		8,13	1,48	—0,05

L'expérience est évidemment trop courte pour être absolument démonstrative ; elle confirme néanmoins les expériences antérieures de Vœltz (1) et celles de Vœltz et Baudrexel (2), qui, en faisant ingérer de la levure en nature à des animaux, ont obtenu une utilisation des protéiques s'élevant à 86 p. 100 de la quantité contenue dans la levure absorbée. Dans l'expérience qui vient d'être rapportée, l'utilisation des protéiques de la viande étant de 91,5 p. 100, celle de la cérévisine s'est élevée jusqu'à 92,8 p. 100, ce qui s'explique peut-être par l'absence complète d'enveloppes cellulaires, de fibres, etc., la totalité du protéique ayant pu être digérée.

(1) W. Vœltz. *Pfügers Archiv*, 1905, **107**, p. 388.
(2) W. Voeltz et A. Baudrexel. *Bioch. Zeitsch*,, 1911, **30**, p. 457, **31**, p. 355.

Résultats généraux et conclusions.

Voici, sommairement exposés, les principaux résultats obtenus au cours de ce travail :

1° On peut extraire, par macération aqueuse de la levure préalablement lavée et séchée selon les données de Lebedew, deux protéiques nouveaux, dont l'un est une phosphoprotéine, l'autre étant une albumine vraie. Les rendements sont considérablement accrus si on opère en milieu faiblement alcalin à la température de 35°;

2° Ces protéiques sont en moyenne dans le rapport de 1 du premier pour 3 du second. Ils existent dans le suc de levure de Buchner préparé soit à la manière ordinaire, soit par congélation à basse température ; on est donc en droit d'admettre leur préexistence dans la levure vivante ;

3° La phosphoprotéine, à laquelle j'ai donné le nom de *zymocaséine*, est insoluble dans l'eau, soluble dans les alcalis et les carbonates alcalins; elle renferme 16,15 p. 100 d'azote et 1,80 p. 100 de phosphore. Par ses propriétés, elle se place entre la caséine du lait et la vitelline de l'œuf; elle coagule sous l'action de la présure, mais moins complètement que la caséine du lait. Dans le suc de levure, elle coagule également sous l'action d'une présure, peu active du reste, qui se trouve dans ce suc. Par ses caractères de coloration, la zymocaséine se rapproche des substances de réserve des grains d'aleurone et des corpuscules métachromatiques, sans que l'on puisse conclure à l'identité ;

4° L'albumine de levure, que j'ai appelée *cérévisine*, est soluble dans l'eau et coagulable par la chaleur dès 41°; elle donne plusieurs coagulations jusqu'à 70°, sans que l'on puisse parler de plusieurs substances différentes. Elle renferme 16,35 p. 100 d'azote et 0,90 p. 100 environ de soufre avec des traces de phosphore probablement accidentelles. Par ses réactions colorées, elle se comporte comme les substances protoplasmiques;

5° L'étude de l'hydrolyse acide de la zymocaséine confirme le rapprochement déjà fait de cette substance avec la caséine du

lait, au point de vue de la répartition de l'azote et des quantités d'histidine, arginine et lysine qu'elle renferme. Quant à la cérévisine, elle paraît assez voisine de certaines albumines végétales comme la léguméline de pois ; elle en diffère cependant par sa moindre teneur en arginine et par sa richesse en lysine, qui en fait le protéique le plus riche en lysine qui soit actuellement connu. C'est à cette albumine qu'il faut en effet rapporter le résultat déjà obtenu par Schrœder avec un mélange mal défini ;

6° Parmi les acides mono-aminés résultant de l'hydrolyse, le plus important est le tryptophane, qui est fourni en quantité notable par les deux protéiques : la zymocaséine en contient 1,51 p. 100 et la cérévisine 2,28 p. 100. Cette dernière est actuellement l'un des protéiques les plus riches en tryptophane qui soient connues ;

7° La teneur particulièrement élevée de la cérévisine en tryptophane et en lysine pourrait faire jouer à ce protéique un rôle important dans l'alimentation, en lui permettant de suppléer, par son mélange avec certains aliments, à l'insuffisance de ceux-ci, en acides aminés indispensables. La cérévisine est très assimilable par l'organisme animal et permet de le maintenir en équilibre azoté ;

8° L'hydrolyse des protéiques de levure sous l'action de la pepsine et de la trypsine conduit à la formation d'albumoses et de peptones, lorsque l'on opère sur des produits isolés de la levure. L'absence de peptones habituellement constatée dans les produits d'autolyse de la levure ou dans le suc de levure est due à l'activité de l'érepsine qui s'y trouve.

D'une manière générale, il semble que les protéiques formés dans l'assimilation azotée de la levure paraissent s'éloigner par certains côtés des protéiques végétaux déjà connus et en particulier de ceux qui forment les réserves des graines.

De nouvelles recherches entreprises chez divers représentants des champignons et des bactéries montreront sans doute si les protéiques de la levure constituent les premiers types d'un nouveau groupe.

D'ores et déjà, il apparaît que l'*Aspergillus niger* renferme une phosphoprotéine, apparemment riche en tryptophane, et

une albumine coagulable, analogues aux deux protéiques extraits de la levure (1). C'est là une première et intéressante confirmation de cette hypothèse.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ABDERHALDEN. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 3e édit., Berlin, 1914.

— Fütterungsversuche mit vollständig abgebauten Nahrungsstoffen. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **77**, p. 22.

ABDERHALDEN et WEIL, Ueber die bei der Isolierung der monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste. *Id.*, 1911, **74**, p. 445; 1912, **77**, p. 59.

BABES, Ueber isoliert farbbare Antheile von Bacterien. *Zeitsch. f. Hygiene*, 1889, **5**, p. 173.

— Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen. *Id.* 1895, **20**, p. 412.

BÉCHAMP, Sur l'épuisement physiologique et la vitalité de la levure de bière. *C. R. Acad. des Sciences*, 1865, **61**, p. 689.

— Nouvelles recherches sur l'épuisement physiologique de la levure de bière. *Id.*, 1874, **78**, p. 645.

BEIJERINCK et VAN HEST, Lebedeff's Hefemazerationsaft. *Folia microbiologica*, 1916, **4**, p. 107.

BLUM et FULD, Ueber eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenlabs unter normalen und pathologischen Zuständen. *Berlin. klin. Woch.*, 1905, n° 44 *a.*

BOKORNY, Albumin in der Hefe. *Zeitsch. f. Spiritusindustrie*, 1900, **18**, p. 33.

BOULLANGER, Action des levures de bière sur le lait. Ces *Annales*, 1897, **11**, p. 720.

E. BUCHNER, Alkoolische Gährung ohne Hefezellen. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1897, **30**, p. 117.

E. BUCHNER, H. BUCHNER et M. HAHN, Die Zymasegährung, Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gährungsproblems. Munich et Berlin, 1903.

DERNBY, Studien über die proteolytische Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse. *Bioch. Zeitsch.*, 1917, **81**, p. 107.

E. FISCHER, Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1901, **33**, 151.

— Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Berlin, 1906.

E. FULD, Ueber die Verbindungen der Eiweisskörper mit Metaphosphorsäure. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 155.

— Zur Theorie und Technik des sogenan. Morgenroth-Versuches. *Bioch. Zeitsch.*, 1907, **4**, p. 54.

GERBER, Analogie entre la coagulation du jaune d'œuf et la caséification du lait par le latex de l'Euphorbia Characias L. *C. R. Soc. de Biol.*, 1913, **74**, p. 53.

(1) P. THOMAS et R. C. MORAN. *C. R. Acad. des Sciences*, 1914, **159**, p. 125.

Geret et Hahn, Zum Nachweis des im Hefepressaft enthaltenen proteolytischen Enzyms. *Ber. deuts. chem. Gesel.*, 1898, **31**, p. 202.

— Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. *Id.*, **31**, p. 2335.

Giglioni, Di un metodo nuovo e simplice per separare la zimazia dal lievito di birra e per estrarre generalmente gli enzimi dai tessuti viventi. *Atti d. Società Italiana per il Progresso delle Scienze*, octobre 1911.

Guilliermond, Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. *Thèse*, Paris et Lyon, 1902.

— Les levures. *Encyclop. scientifique*, Paris, 1921.

Guilliermond et Mawas, Caractères histochimiques des granulations des mastzellen et rapport de ces corps avec la volutine des protistes. *C. R. Soc. de Biol.*, 1908, **64**, p. 307.

Guilliermond et Beauverie, Caractères histochimiques des globoïdes de l'aleurone. *Id.*, p. 482.

Hausmann, Ueber die Verteilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1899, **27**, p. 95; 1900, **29**, p. 136.

Henry et Auld, On the probable Existence of Emulsin in Yeast. *Proc. Royal Society*, 1905, série B, **76**, p. 568.

Kayser, Action de la chaleur sur les levures. Ces *Annales*, 1889, **3**, p. 513.

Kohl. Die Hefepilze. Leipzig, 1908.

A. Kossel. Ueber das Nuclein der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1879, **3**, p. 284; 1880, **4**, p. 290 et suiv.

— Untersuchungen über die Nucleine, Strasbourg, 1881.

Kossel et Kutscher, Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1900, **31**, p. 165.

Kossel et Pringle, Ueber Protamine und Histone. *Id.*, 1906, **49**, p. 301.

Kutscher, Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1902, **32**, p. 59 et 419; **34**, p. 517.

Kutscher et Lohmann, Die Endprodukte der Pankreas und Hefeselbstverdauung. *Id.*, 1903, **39**, p. 159 et 313.

Van Laer, Brevet D. R. P. 117303, 1898. *Chem. Centralbl.*, 1901, **1**, p. 352.

Lebedew, Extraction de la zymase par simple macération. *C. R. Acad. des Sciences*, 1911, **152**, p. 49.

A. Meyer, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. *Botan. Zeitung*, 1904, **62**, p. 113.

Morgenroth, Ueber den Antikörper des Labenzyms. *Centralbl. f. Bakter.*, 1899, **26**, p. 349.

Naegeli et Loew, Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1878, **17**, p. 403; *Liebigs Annalen*, **193**, p. 322.

Osborne. The vegetable Proteins. Londres, 1916.

Osborne et Harris, Nitrogen in Protein Bodies. *Journ. of Amer. Chem. Society*, 1913, **25**, p. 323.

Osborne et Mendel. Revue américaine *Science*, 1911, **34**, p. 722; *Journ. of biol. Chem.*, 1911-1919, **10** et suivants.

Palladin, Zur Kenntniss der gegenseitigen Abhängigkeit zwischen Eiweissabbau und Atmung der Pflanzen. *Bioch. Zeitsch.*, 1912, **44**, p. 318.

Payen, Sur le développement des végétaux, 3e mémoire. *Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences*, 1846, **9**, p. 32.

Pfeffer. Physiologie végétale, trad. Friedel. Paris, 1905.

Plimmer et Scott, A reaction distinguishing Phosphoprotein from Nucleo-

protein and the Distribution of Phosphoproteins in Tissues. *Journ. of the chem. Society*, 1908, **93**, p. 1699.

Reinke et Rodewald, Die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas von Aethalium septicum. *Untersuchung a. d. botan. Institut d. Univers. Göttingen*, 1881, **2**, p. 54 et *Botan. Zeitung*, 1880, **38**, p. 315.

P. Rona, *in* Oppenheimer's Handbuch der Biochemie, Iena, 1908-1912.

Salkowski, Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1889, **13**, p. 506.

Schlossberger, Ueber die Natur der Hefe, mit Rücksicht auf die Gährungserscheinungen. *Liebigs Ann. Chem. u. Pharm.*, 1844, **51**, p. 193.

Schroeder, Zur Kenntniss der Proteinsubstanzen der Hefe. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1902, **2**, p. 389.

Schutzenberger, Faits pour servir à l'histoire de la levure de bière. *C. R. Acad. des Sciences*, 1874, **78**, p. 493.

Sedlmayr, Beiträge zur Chemie der Hefe. *Zeitsch. f. d. ges. Brauwesen*, 1909, **26**, p. 384.

Stutzer, Vorkommen von Nuclein in der Schimmelpilze und in der Hefe. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1882, **6**, p. 572.

P. Thomas, Sur les substances protéiques de la levure. *C. R. Acad. des Sciences*, 1913, **156**, p. 2024.

P. Thomas et S. Kolodziejska, Les substances protéiques de la levure et leurs produits d'hydrolyse. *Id.*, 1913, **157**, p. 243.

P. Thomas et R. C. Moran, Les substances protéiques de l'Aspergillus niger. *C. R. Acad. Sciences*, 1914, **159**, p. 125.

P. Thomas, Présence et dosage du tryptophane dans les matières protéiques de la levure, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1914, **1**, p. 67.

Udransky, Ueber Furfurolreaktionen. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1888, **12**, p. 42.

Völtz, Ueber den Einfluss verschiedener Eiweisskörper und einiger Derivate derselben auf den Stickstoffumsatz. *Pflügers Archiv*, 1905, **107**, p. 388.

Völtz et Baudrexel, Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus. *Bioch. Zeitsch.*, 1911, **30**, p. 457.

Vozarik, Verfahren zur Veraschung von Nahrungsmittel und von anderen organischen Stoffen zwecks Bestimmung ihres Phosphorgehalt. *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1912, **76**, p. 426.

Wroblewski, Zusammensetzung des Buchner'schen Hefepressaftes. *Ber. deuts. chem. Gesell.*, 1898, **31**, p. 3218.

Proc. amer. physiol. Society, dans *Amer. Journ. of Physiol.*, 1908, **21** (sans nom d'auteur).

LE DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE CHEZ LES BOVIDÉS AU MOYEN DE L'ANTIGÈNE DE BESREDKA

par les Drs

Ch. HRUSKA (Prague) et W. PFENNINGER (Zurich).

Le diagnostic clinique de la tuberculose chez les bovidés est, en général, difficile, alors même que la maladie est déjà avancée. Aussi nous sommes-nous demandé si l'on ne saurait appliquer au diagnostic de la tuberculose bovine la méthode de fixation de l'alexine.

Dès la découverte de la réaction Bordet-Gengou il a été fait beaucoup de tentatives pour déceler des anticorps dans les sérums d'individus et d'animaux tuberculeux. Nous nous bornerons à citer ici les principaux travaux relatifs à la tuberculose des bovidés. Hennepe (1) et Jousset (2), en examinant les sérums de veaux vaccinés avec du Tauruman, du Bovovaccin et des bacilles humains, constatèrent la présence d'anticorps fixant le complément en présence des antigènes correspondants. Ruppel et Rickman (3) trouvèrent sur 60 bovidés la réaction de fixation négative 9 fois; 51 sérums leur donnèrent une réaction positive, quoique chez 25 seulement ils constatèrent la tuberculose à l'autopsie.

Weber et Dieterlen (4) affirment n'avoir pas rencontré d'anticorps dans les sérums de bovidés sains, et en avoir pres que toujours trouvé chez des bovidés atteints de tuberculose spontanée ou expérimentale.

Bach (5) conclut, au contraire, de ses recherches, que les

(1) *Inaug.-Dissert.* Berne, 1909.
(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 1909, **67**, n° 37.
(3) *Zeitsch. f. Immunit' tsf.*, 1910, **6**, p. 344.
(4) *Arb. a. d. k. Gesundheitsamtes*, 1910, f. 10, p. 217.
(5) *Inaug.-Dissert.*, Leipzig, 1909.

bovidés, qu'ils soient sains, peu ou fortement atteints de tuberculose, se comportent de même au point de vue de la réaction de fixation, en présence d'une émulsion de bacilles tuberculeux, et que, par conséquent, la méthode est impropre au diagnostic. Des résultats meilleurs furent obtenus par Hammer (1); cet auteur examina 96 bovidés dont 46 tuberculeux; la réaction de fixation fut positive chez tous les animaux ayant présenté des lésions tuberculeuses et chez plusieurs non tuberculeux. Tout récemment, Borrel et Boez (2) employèrent, à titre d'antigène, de vieux bacilles humains broyés et extraits avec l'alcool. Ils examinèrent 20 sérums de bovidés tuberculeux et 60 sérums de bovidés sains; les tuberculeux leur donnèrent 80 p. 100, les bovidés sains 6 p. 100 de résultats positifs. Bang et Andersen (3) ont constaté la réaction de fixation positive chez les animaux infectés avec des bacilles acido-résistants; c'est surtout le sérum de vaches atteintes de la maladie de Johne, qui, dans leurs expériences, fixait le complément, et cela aussi fortement que le sérum de vaches tuberculeuses. Ces auteurs ont pu constater la présence des mêmes anticorps dans le lait des vaches atteintes de la tuberculose de la mamelle et de l'entérite paratuberculeuse très avancée.

Technique.

Dans toutes nos expériences le sang était prélevé directement dans le cœur, aussitôt que l'animal était abattu. Une dissection minutieuse des organes permettait de nous rendre compte de l'étendue des lésions tuberculeuses. Nous disposions de la sorte d'un moyen de contrôle beaucoup plus précieux que celui fourni par l'examen purement clinique. Nous étions donc à même de juger exactement de la valeur diagnostique de la réaction. Les échantillons de sang centrifugés, chauffés (pendant 30′ à 56°), conservés à la glacière jusqu'au lendemain, étaient utilisés deux jours après leur récolte, au plus tard. Dans la plupart des sérums nous avons observé qu'une coagulation

(1) *D. tier. Woch.*, 1912, n° 39, p. 593.
(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 1920, **83**, p. 1130.
(3) *Centralbl. f. Bakter.*, 1913, Orig. 69, p. 517.

secondaire se produisait après la centrifugation; ce phénomène se reproduisait souvent une ou deux fois et rendait parfois difficile l'obtention de sérum liquide. Ces coagulations successives s'observent aussi bien avec les sérums d'animaux tuberculeux que d'animaux sains.

La technique que nous avons suivie fut celle adoptée dans le laboratoire de M. Besredka pour l'examen des sérums humains. On prenait une dose fixe d'antigène (0,3), et on faisait varier la dose d'alexine (diluée à 1/15) (Calmette-Massol). L'alexine était titrée, au préalable, en présence de deux sérums normaux, et pour éviter toute erreur d'interprétation, aussi en présence d'antigène.

Voici le modèle de titrage de l'alexine :

Sérum normal.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène.	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alexine à 1/15.	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau physiologique. . .	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4

Après avoir laissé les tubes pendant une heure à l'étuve, on ajoute 1 cent. cube de globules rouges (5 p. 100) sensibilisés (15′ avant l'emploi); on les remet à l'étuve pendant 30′, après quoi on fait la lecture. Ordinairement, l'hémolyse est obtenue déjà avec 0 c. c. 2 d'alexine à 1/15; on emploie dans ce cas pour la réaction des doses croissantes, à partir de 0 c. c. 2 par exemple : 0 c. c. 2; 0 c. c. 25; 0 c. c. 3; 0 c. c. 4; 0 c. c. 5. Un tube témoin ne contenant pas d'antigène nous renseigne si le sérum à examiner est empêchant par lui-même. Nous estimons ce témoin indispensable, attendu que certains sérums normaux des bovidés sont doués d'un pouvoir inhibant très accusé.

Avant d'ajouter des globules sensibilisés, nous laissons les tubes une heure à la température du laboratoire, puis, une heure à 37° à l'étuve. Après l'addition des globules, nous portons les tubes à l'étuve pendant 40′. Il est très utile, pour la juste appréciation de la réaction, d'employer en même temps chaque fois plusieurs sérums sûrement normaux.

Nos recherches ont porté sur 90 sérums de bovidés sains et sur 304 sérums de bovidés tuberculeux, à tous les degrés de la maladie. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

Nous avons établi six catégories, suivant l'étendue des lésions et les organes touchés.

	Total	Négatifs	Positifs	P. 100 des positifs
	—	—	—	—
Bovidés non tuberculeux	90	88	2	2,2
Bovidés tuberculeux	304	47	257	84,5

	Positifs	Négaifs	P. 100 des positifs
	—	—	—
I. — *Tuberculose exclusivement ganglionnaire* (médiast., bronch., mésenter., rétrophar.)	28	41	59,4
II. — *Tuberculose ganglionnaire* avec tuberculose discrète des poumons	14	74	84,1
III. — *Tuberculose ganglionnaire, pulmonaire* et *pleurale*	2	36	94,7
IV. — *Tuberculose des poumons, des séreuses pleurales et péritonéales, et des viscères*	2	34	94,4
V. — *Tuberculose généralisée*	0	56	100,0
VI. — *Tuberculose miliaire*	1	16	94,1

Nous estimons que si l'on s'était contenté de l'examen clinique seul, ces lésions auraient passé inaperçues chez :

39	bovidés de la catégorie	I
74	—	II
16	—	IV et V
16	—	VI

Au total, 145 bovidés sur 257 ayant donné des résultats positifs à la séro-réaction (soit 56,4 p. 100) n'auraient pas été reconnus cliniquement. Notons que la grande majorité des animaux, ayant présenté à l'autopsie une tuberculose généralisée ou miliaire, présentaient un très bon état général; c'est surtout chez ces animaux que, à notre avis, la réaction offre une grande valeur pratique.

Il ressort du tableau qu'un parallélisme indéniable existe entre l'étendue du processus tuberculeux et la fréquence des résultats positifs. Fait à noter, alors que les bovidés atteints de la tuberculose miliaire donnent presque toujours une réaction positive, l'homme montre en pareil cas, le plus souvent, une réaction négative. Les sérums bovins sont d'autant plus fréquemment riches en anticorps que les lésions sont plus étendues. Les cas, dans lesquels le processus tuberculeux est en pleine évolution, sont ceux où la réaction de fixation est la plus nette.

Il est évident que, pour le séro-diagnostic de la tuberculose, le rôle de l'antigène est d'une importance particulière; de sa valeur, c'est-à-dire, de la facilité avec laquelle il se combine avec l'anticorps, dépend la réussite de la réaction. C'est pourquoi la plupart des tentatives pour utiliser la méthode de fixation dans la tuberculose demeurèrent jusqu'à présent stériles ou ne donnèrent que des résultats peu satisfaisants.

L'antigène employé dans nos recherches était d'abord de provenance humaine. On pouvait se demander si, en employant un antigène d'origine bovine nous n'aurions pas obtenu des résultats encore meilleurs. Nous avons soumis un certain nombre de sérums à la réaction de fixation, en nous servant d'un antigène bovin, préparé de la même façon que l'antigène humain. Or, il résulte de nos expériences, faites simultanément avec les deux antigènes que, contrairement à notre attente, c'est l'antigène humain qui avait mieux fixé que le bovin: si la proportion des cas positifs a été sensiblement la même dans les deux cas, nous avons eu l'impression qu'en présence de l'antigène humain, la réaction de fixation était plus stable. Ces expériences comparatives ont porté sur 88 sérums de bovidés tuberculeux. Sur ce nombre, il y eut 80 positifs avec l'antigène humain et 70 avec l'antigène bovin.

Pour nous résumer :

1° L'antigène de Besredka fixe l'alexine en présence de sérums des bovidés tuberculeux; il nous a donné une réaction positive dans 84,5 p. 100 de la totalité de cas (sur 304 sérums).

2° En présence des sérums des bovidés n'ayant montré à l'autopsie aucune lésion à l'examen macroscopique, l'antigène n'a donné de résultat positif que dans 2,2 p. 100 des cas (sur 90 sérums).

3° Les résultats fournis par la réaction de fixation sont intimement liés à l'étendue des lésions constatées à l'autopsie. Les bovidés atteints d'une tuberculose très peu avancée (tuberculose ganglionnaire) donnent la réaction positive dans 60 p. 100 des cas; ceux qui présentent des lésions plus étendues (tuberculose pulmonaire, pleurale, péritonéale, viscérale) réagissent positivement dans 84-95 p. 100 des cas; enfin, les animaux atteints d'une tuberculose généralisée, mais jouis-

sant d'un bon état général, donnent une réaction positive dans 100 p. 100 des cas.

Nous estimons que la méthode de fixation de l'alexine est appelée à rendre d'importants services dans la lutte contre la tuberculose bovine, et que, dans la méthode d'extinction préconisée par Bang, elle pourra remplacer avantageusement l'ophtalmo-réaction.

En terminant, nous prenons la liberté d'exprimer notre plus profonde reconnaissance à M. le professeur Besredka qui nous donna le sujet de ce travail. Nous remercions également M. le D[r]. Morel, directeur sanitaire et MM. les vétérinaires sanitaires de l'abattoir de la Villette, pour leur bienveillance et l'autorisation de prendre part aux autopsies.

INFLUENCE DES VITAMINES ET DES AUXIMONES SUR LA CROISSANCE DES VÉGÉTAUX

par Auguste LUMIÈRE.

I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Eykmann (1) a observé le premier que les poulets nourris exclusivement avec du riz décortiqué maigrissaient progressivement et mouraient en trois ou quatre semaines, alors que l'addition de la cuticule de ce riz à leur régime alimentaire permettait, au contraire, de maintenir l'équilibre vital de ces animaux.

Il en conclut que la cuticule de la graine renferme une substance indispensable à l'entretien du métabolisme normal chez ces oiseaux.

Osborne et Mendel (2), puis Hopkins (3) ont montré en outre que la croissance des jeunes rats ne pouvait être assurée par des rations alimentaires composées de matières protéiques pures, d'hydrates de carbone, de graisses et de sels, même offertes à ces animaux en quantité surabondante. Leur développement ne pouvait se produire qu'en ajoutant à ces aliments de très petites quantités de substances extraites du lait ou de certaines cellules végétales.

Stepp (4) ne put parvenir, d'autre part, à entrenir la vie des souris en les nourrissant au moyen d'aliments épuisés par l'alcool, alors que l'extrait alcoolique résultant de cet épuisement, évaporé à froid et ajouté à nouveau à ces aliments, permet d'assurer leur existence prolongée.

(1) Eykmann. *Virchow's Archiv*, 1897, **148**, p. 523; *Archiv f. Hyg.*, 1906, p. 150, 170.
(2) Osborne et Memdel. Carnegie Institute public., 1911, p. 156.
(3) Hopkins. *Journ. Physiol.*, 1912, **44**.
(4) W. Stepp. *Bioch. Zeitsch.*, 1909, p. 452; *Zeitsch. f. Biol.*, 1912, p. 135, 171

Enfin, quelle que soit la composition d'un régime alimentaire, les animaux qui y sont soumis finissent par mourir si les matériaux qui le constituent ont été chauffés à l'autoclave à 130° pendant un temps suffisant.

Ces différents traitements — décortication, épuisement par l'alcool ou chauffage convenable — semblent donc enlever ou détruire dans les aliments un ou plusieurs principes indispensables à l'entretien de la vie.

Avant la constatation des faits qui viennent d'être sommairement rappelés, on avait toujours considéré que la permanence des fonctions vitales et la croissance des animaux pouvaient être assurées au moyen de rations d'entretien convenables au point de vue énergétique et renfermant des poids suffisants de corps gras, de matières albuminoïdes et de substances hydrocarbonées et salines, alors qu'en réalité certains autres éléments de constitution chimique inconnue et agissant à doses extrêmement faibles, paraissent indispensables à la nutrition normale. Ce sont ces éléments qui ont reçu le nom de *vitamines* ou de *facteurs accessoires ou complémentaires de la croissance et de l'équilibre*.

Frappé de ces observations, le professeur Bottomley (1) s'est demandé si les vitamines ne pourraient pas jouer également un rôle dans le métabolisme des végétaux.

C'est pour vérifier cette hypothèse qu'il entreprit en 1913, au Royal Garden de Kew, une série d'investigations sur les bases suivantes :

Ayant eu l'occasion d'étudier la valeur en tant qu'engrais de la tourbe de *sphagnum* ensemencée depuis quinze jours avec une culture mixte de micro-organismes aérobies du sol, il remarqua la transformation, par ce traitement bactérien, de l'acide humique en humates solubles; il constata en outre que cette *tourbe bactérisée*, après stérilisation, constituait un excellent milieu pour le développement des microbes fixateurs de l'azote, et qu'une substance stimulante de la croissance avait pris naissance dans la tourbe ainsi préparée.

(1) W. B. Bottomley. Some accessory factors on plant growth and nutrition. *Proc. of the Royal Soc. of London. Biol. Sciences*, 1914, p. 237, 240; A bacterial test for plant food accessories (*Auximones*). *Proc. of the Royal Soc. of London.*

Le D[r] Rosenheim, du King's College, constata ensuite que les semis de *Primula malacoïdes* étaient, au bout de six semaines de croissance, d'une taille double de celle des plantes témoins, lorsqu'on les avait arrosés à deux reprises avec un extrait aqueux de tourbe bactérisée.

Ces résultats firent supposer à ces auteurs que la stimulation de la croissance pouvait être attribuée à une ou plusieurs substances analogues aux vitamines.

Bottomley crut confirmer ces vues dans les expériences que nous allons sommairement résumer :

Considérant que les facteurs accessoires ou complémentaires de la croissance et de l'équilibre chez les animaux sont solubles dans l'eau et dans l'alcool, il supposa qu'il devait en être de même pour les corps actifs contenus dans la tourbe bactérisée, et il obtint, en effet, par épuisement de cette tourbe à l'alcool, un extrait qui, évaporé dans le vide et repris par l'eau, fut reconnu pour un stimulant efficace de la cellule végétale.

Dans un milieu renfermant : 1 gramme de mannite, 0 gr. 20 de PO^4K^2H et de $CaCO^3$ et 0,02 de SO^4Mg pour 100 cent. cubes d'eau distillée, Bottomley ajoutait 1 cent. cube d'une solution aqueuse de cet extrait amené à une dilution correspondant à 10 grammes de tourbe bactérisée par litre; puis, après stérilisation, le liquide était ensemencé avec l'*Azotobacter chroococcum*. Après huit jours d'incubation à 26°, le poids de l'azote fixé était environ quatre fois plus considérable dans les cultures renfermant l'extrait de tourbe bactérisée que dans les cultures témoins faites avec le même milieu, mais sans addition d'extrait.

Cooper et Funk (1) avaient montré en 1911 que la substance curative de l'avitaminose chez le poulet était entièrement précipitée par l'acide phosphotungstique, et Bottomley, continuant ses recherches dans une voie parallèle, put séparer par un procédé d'extraction identique la fraction de l'extrait de tourbe précipitable par ce réactif. Le traitement de la combinaison phosphotungstique par la baryte conduisit à une matière douée de propriétés stimulantes vis-à-vis des végétaux,

(1) Cooper et Funk. *Lancet*, 1911, p. 1267.

mais à un degré beaucoup moindre cependant que l'extrait aqueux total.

L'auteur précité en fit la démonstration en cultivant la *Lemna minor* sur le liquide minéral de Detmer, additionné d'extrait provenant de la combinaison phosphotungstique (dix-sept parties d'extrait sec par million de parties de solution).

Les résultats obtenus après trois mois et demi d'expériences montrent une multiplication plus rapide sur le liquide additionné d'extrait que sur la solution témoin, résultat beaucoup moins favorable cependant qu'en employant l'extrait de tourbe bactérisée sans aucun traitement.

Bottomley désigne sous le nom d'*Auximones* (αὔξιμος : exaltant le développement) ces substances non chimiquement définies favorisant la croissance des végétaux.

En 1917, Mockeridge (1) donna plus d'extension encore à ces essais en les appliquant à l'étude des différentes phases du cycle de transformation que subissent les matières azotées dans le sol.

Les conclusions de cet auteur peuvent se résumer ainsi : les substances solubles extraites de la tourbe bactérisée augmentent la vitesse de fixation de l'azote et la nitrification, diminuent la dénitrification et paraissent sans effet appréciable sur la formation des composés ammoniacaux dans le sol.

D'autre part, C. Jordan Lloyd (2), Cordon et T. C. Hyne (3), Sydney W. Cole et D. Jordan Lloyd (4), MM. H. Agulhon et Legroux (5) ont attribué à des vitamines les résultats favorables qu'ils ont obtenus en cultivant le gonocoque, le méningocoque ou le bacille de Pfeiffer sur certains milieux renfermant des matières organiques complexes.

Enfin, M. Linossier (6) cultivant divers champignons :

(1) Florence A. Mockeridge. Some effects of organic growth promoting substances (*Auximones*) on the soil organismus concerned in the nitrogen cycle *Proc. of the Royal Soc. of London. Biol. Sc.*, **89**, série 8, p. 508, 533.

(2) C. Jordan Lloyd. *British Med. Journ.*, 1916, **2**, p. 143.

(3) M. H. Cordon et T. C. Hyne. *British Med. Journ.*, 1916, **2**, p. 678.

(4) Sydney W. Cole et D. Jordan Lloyd. *Journ. of Path. and. Bact.* 1916, **21**, p. 267.

(5) H. Agulhon et Legroux, *C. R. Acad. des Sc.*, 21 octobre 1918, p. 597.

(6) Linossier, Les vitamines et les champignons. *C. R. Soc. de Biol.*, 12 avri 1919, p. 381 et 20 mars 1920, p. 346.

Oïdium lactis, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Mycoderma vini*, etc., dans des bouillons pauvres, a constaté que, pour quelques-uns d'entre eux, l'addition d'une faible quantité d'infusion de raisins secs, riche en vitamines, augmentait les récoltes d'une manière importante; d'après cet auteur, certaines espèces de champignons pourraient se passer de vitamines, tandis que d'autres exigeraient la présence de ces substances pour se développer.

L'influence de ces vitamines se ferait sentir principalement dans le cas où la vitalité des micro-organismes est atténuée.

II

Toutes ces expériences ne satisfont pas l'esprit, à notre sens, et ne constituent pas une démonstration péremptoire de la nécessité des vitamines pour le développement des végétaux. Mais avant de les discuter, il est indispensable de se mettre d'accord sur le sens du mot *Vitamine*. M. Linossier s'explique de la manière suivante, sur la signification qu'il attache à ce terme :

« Je répète que je prends le mot vitamine dans son sens le plus large — substances *mal définies, nécessaires* à très petite dose au développement et à l'entretien d'un être vivant. Depuis que l'attention a été appelée sur ces substances, chaque auteur, guidé par ses conceptions personnelles, tend à restreindre la signification du mot. Il faudra y arriver certainement un jour, mais actuellement, nous ne sommes pas assez documentés pour formuler une définition *ne varietur*, et il me paraît inutile de changer un nom médiocre sans doute, mais que nous ne serions pas sûrs de remplacer par un meilleur. A des notions vagues doivent correspondre des dénominations vagues. Cela soit dit parce qu'on a contesté la valeur du mot vitamine dans le cas particulier qui a fait l'objet de ma première communication et de celle-ci (1). »

Nous admettons parfaitement ce raisonnement, et acceptons, faute de mieux, la définition du néologisme *Vitamine* à laquelle

(1) Linossier. *C. R. Soc. de Biol.*, 20 mars 1920, p. 346.

M. Linossier s'est rallié; mais il ne semble pas alors qu'on puisse faire rentrer dans le cadre de cette définition les Auximones de Bottomley et les matériaux utiles aux champignons dont M. Linossier s'est occupé.

En effet, le caractère principal des vitamines est d'être nécessaires, nous ajouterons même indispensables à la vie; si nous les supprimons de la nourriture des animaux, ces animaux meurent infailliblement.

Si elles sont nécessaires, cela veut dire qu'il n'est pas possible de les remplacer par autre chose, par d'autres produits de constitution chimique connue. Si leur substitution pouvait être réalisée, elles ne seraient plus nécessaires, indispensables : ce ne seraient plus des vitamines.

Or, les extraits de tourbe bactérisée peuvent être remplacés par des composés définis, et il est facile de cultiver des champignons sur des milieux convenables dépourvus de toute substance vitaminique.

Raulin n'a-t-il pas montré, au cours de ses belles recherches poursuivies dès 1870 (1), que l'*Aspergillus niger* se développe abondamment au sein d'une solution ne renfermant que des substances de constitution chimique parfaitement déterminée ?

D'ailleurs, si nous supprimons de cette solution un certain nombre des substances qu'elle renferme, la végétation sera moins abondante, mais pourra s'effectuer néanmoins.

Les exigences de la cellule végétale sont remarquablement réduites; elle s'accommode des aliments les plus simples et les plus divers. Avec l'eau, l'air et quelques sels métalliques, elle construit les molécules organiques les plus compliquées, *sans l'intervention d'aucune vitamine*. Sa puissance de synthèse est vraiment extraordinaire.

On sait avec quelle fréquence des solutions ne renfermant qu'un seul composé chimique défini, métallique ou organique, peuvent être envahies par des moisissures. En voici un exemple personnel :

En vue d'expériences qui n'avaient en principe rien de commun avec les investigations qui font l'objet du présent travail,

(1) Raulin, Etudes chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel. *Annales des Sc. natur., Botanique*, 1870.

nous avions préparé, l'an dernier, des dissolutions à 1 ou 2 p. 100, suivant leur solubilité, de différents corps dans du sérum physiologique (NaCl à 8 p. 100). Ces solutions avaient été abandonnés à la température du laboratoire dans des flacons bouchés sans précautions spéciales. Au bout de six mois, un grand nombre d'entre elles était altéré par les moisissures plus ou moins abondantes, et ce développement mycélien s'était produit aussi bien dans celles de nos solutions qui ne renfermaient que des corps minéraux, tel que du phosphate de chaux ou de l'hypophosphite de sodium, etc... que dans celles qui contenaient les substances organiques les plus différentes, comme l'acide lactique, le benzoate de sodium, l'acétate de calcium, la phloroglucine, le sulfocyanate d'hexaméthylène tétramine, le sulforicinate de sodium, etc... Un grand nombre de ces liqueurs s'était donc comporté comme des milieux de culture. Bien que complètement privés de vitamines, ces milieux avaient pu, par le seul moyen d'éléments simples, carbone, hydrogène, oyxgène et azote, empruntés à l'air et à l'eau distillée, assurer la synthèse des corps compliqués formant les tissus des végétaux inférieurs.

Et ce ne sont pas seulement certains êtres aussi simples que les microbes et les moisissures, qui sont capables de se multiplier dans des solutions ne contenant que des composés minéraux; mais les plantes les plus complexes peuvent elles-mêmes se contenter de semblables milieux dépourvus de tout corps organique.

Mazé (1) a pu réaliser l'évolution complète du maïs dans une solution ne refermant que des sels inorganiques — nitrate de sodium, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, sulfate ferreux, silicate de potassium, chlorure de zinc, chlorure de manganèse, carbonate de calcium, fluorure de sodium, sulfate d'aluminium, borate de sodium et iodure de potassium, comportant au total quinze corps simples, indépendamment de l'oxygène, de l'hydrogène, de l'azote et du carbone empruntés à l'eau et à l'air.

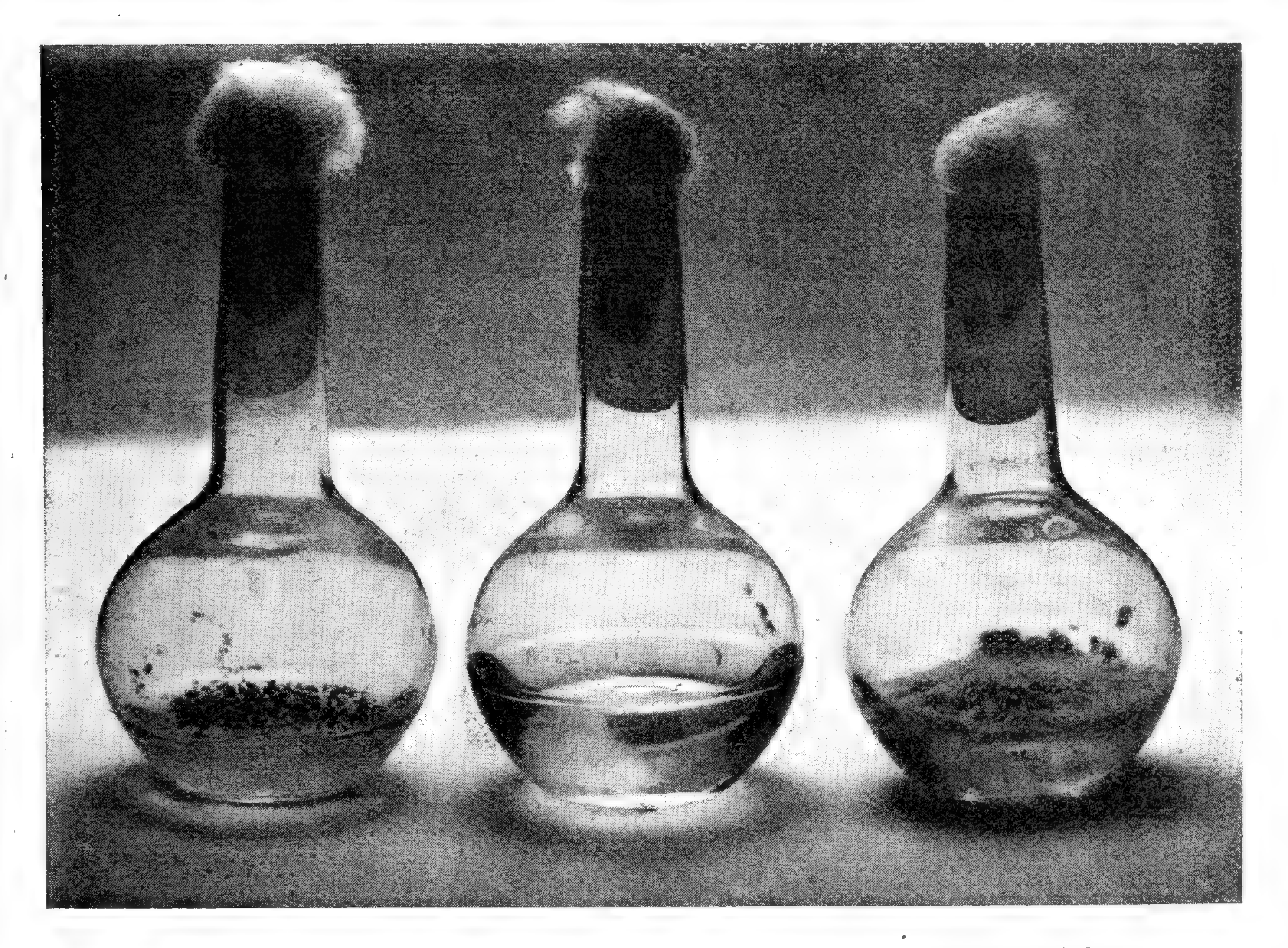
On ne comprend guère que les exigences des végétaux supé-

(1) MAZÉ, Recherche d'une solution purement minérale, capable d'assurer l'évolution complète du maïs cultivé à l'abri des microbes. Ces *Annales*, mars 1919, p. 139.

rieurs, comme le maïs, puissent se limiter strictement à des aliments minéraux, alors que la culture de quelques microbes et de quelques plantes seulement nécessiterait l'intervention de vitamines pour proliférer.

Dans leurs expériences sur les végétaux, les auteurs précédemment cités se sont adressés à des milieux de culture pauvres, ne renfermant point les aliments convenables pour

Figure 1.



Raisins secs. Témoin. Winogradsky.

assurer une abondante pullulation, et, du moment que, dans de tels milieux, les champignons peuvent néanmoins proliférer, il faut bien admettre que l'addition d'un certain nombre de produits, définis ou non, est capable d'améliorer considérablement les qualités nutritives de ces milieux, sans que pour cela ces produits soient des vitamines.

Nous avons vérifié ce fait par l'expérience suivante : Ayant réparti le bouillon à base de tartrate d'ammoniaque et de glycérine, employé par M. Linossier, dans une série de ballons Pasteur, nous avons ajouté dans les uns des sels minéraux

composant les solutions de Winogradsky et de Mazé, ne renfermant que des sels inorganiques, et dans les autres, quelques gouttes d'infusion de raisins secs. Ces milieux ont été ensemencés en même temps que la solution mère témoin, avec le *Penicillium glaucum*; les cultures comparatives, photographiés huit jours après l'ensemencement, sont reproduites dans la figure 1 et montrent que la végétation est plus abondante dans les solutions salines convenables que dans le bouillon additionné d'infusion de raisins secs (fig. 1).

Ces résultats démontrent que les vitamines ne sont nullement nécessaires à la croissance des végétaux.

Si l'on voulait admettre, non pas même la nécessité, ce qui serait absolument contraire à l'expérience précédente, mais seulement l'utilité des vitamines pour assurer le métabolisme de la cellule végétale, il faudrait démontrer : 1° que les matériaux de constitution inconnue provenant, soit de la tourbe bactérisée de Bottomley, soit de l'infusion de raisins secs de M. Linossier, renferment des vitamines; 2° que ce ne sont pas les corps organiques ou minéraux autres que ces vitamines contenus aussi dans ces matières qui exercent l'action favorisante constatée.

Ces preuves ne ressortent nullement des expériences instituées par ces auteurs. C'est du moins ce que nous pensons pouvoir prouver en discutant les deux questions que nous venons de soulever.

A. — L'infusion de raisins secs de M. Linossier et l'extrait de tourbe bactérisée de Bottomley renferment-ils des vitamines?

Il convient d'observer tout d'abord que ces substances fertilisantes ont été employées après chauffage à 130°, et on admet généralement que les vitamines sont détruites à cette température. Quelques expérimentateurs cependant ont remarqué que la stérilisation ne supprimait pas toujours d'une façon complète les propriétés antiscorbutiques des aliments.

D'après Hant, Steenbock et Smith (1), le lait stérilisé à 120°,

(1) A. B. Hant, H. Steenbock et D. W. Smith, Action de la chaleur sur les propriétés antiscorbutiques de quelques produits lactés. *Journ. of Biol. Chem.* 1919, p. 305, 324.

le lait commercial condensé et sucré, et la poudre de lait perdraient bien leurs propriétés antiscorbutiques employés à la même dose de lait cru qui protège les animaux; mais en augmentant la proportion de produits chauffés, on parviendrait cependant à préserver ces animaux des accidents de la carence.

Richet (1) a constaté en outre que des chiens nourris exclusivement avec de la viande stérilisée à 135° meurent rapidement, tandis que si leur ration comprend un mélange de pain et de viande stérilisés à la même température, leur équilibre vital peut être maintenu.

Daniels et Mc Clurg (2) ont constaté que les vitamines résistent à la chaleur en milieu neutre ou acide, mais sont altérées par chauffage lorsque leur réaction est alcaline.

La destruction des substances vitaminiques par la stérilisation à l'autoclave à 130° ne semble donc pas toujours certaine, et nous ne pouvons pas, *a priori*, admettre que les auximones et l'infusion de raisins secs chauffés dans ces conditions ne renferment plus de produits vitaminiques.

Nous avons cherché à élucider ce problème, non en partant de l'extrait de tourbe bactérisée, parce que nous avons éprouvé des difficultés à nous procurer les matériaux nécessaires à l'expérience, mais en utilisant l'infusion de raisins secs ; nous avons pu, après stérilisation à 135° pendant 2 heures et évaporation à consistance sirupeuse, administrer cette préparation à des pigeons atteints de troubles cérébelleux aigus, et obtenir une amélioration passagère de l'état de ces animaux, montrant que les corps antibéribériques n'avaient pas été complètement détruits par le chauffage.

Cependant, cet extrait est impuissant contre les accidents scorbutiques du pigeon qui meurt malgré son administration dès l'apparition des premiers symptômes de carence.

M. Linossier a donc, à juste titre, considéré que l'infusion de raisins secs stérilisée pouvait encore renfermer quelques produits vitaminiques, mais ces produits semblent altérés et ne

(1) Richet. *Soc. de Biol.*, juin 1919.
(2) Amy L. Daniels et Nelle I Mc Clurg, Influence of high temperature and dilute alkalies on the antineuritic properties of foods. *Journ. of Biol. Chem.* 1919, p. 201, 215.

jouissent plus de l'activité des extraits non stérilisés. Il est possible qu'il en soit de même pour les Auximones de Bottomley.

B. — Le pouvoir fertilisant des extraits de tourbe bactérisée et de raisins secs est-il dû aux résidus de vitamines, ou aux autres produits minéraux ou organiques qu'ils peuvent renfermer ?

On sait que certains liquides de provenance humorale ou cellulaire, comme le sérum des animaux et le suc frais des plantes riches en vitamines, contiennent des bactériolysines qui entravent le développement des microbes : ces bactériolysines sont détruites par chauffage à 100°.

Ce fait paraît encore aller à l'encontre de l'opinion qui accorde aux vitamines un pouvoir accélérateur dans la végétation.

Nous avons remarqué souvent que certaines espèces bactériennes poussent mieux sur des milieux qui ont été stérilisés à l'autoclave que sur ceux qui ont été filtrés à la bougie. La stérilisation par la chaleur, qui s'accompagne en général, sinon toujours, de la détérioration complète des vitamines, et qui réalise en tout cas leur atténuation et leur destruction partielle, est au contraire favorable à la végétation microbienne.

L'expérience suivante le démontre nettement.

Nous nous sommes adressé pour cette investigation à un milieu végétal renfermant des éléments non coagulables par la chaleur, afin de ne pas précipiter, par le passage à l'autoclave, une fraction de ces matériaux alimentaires.

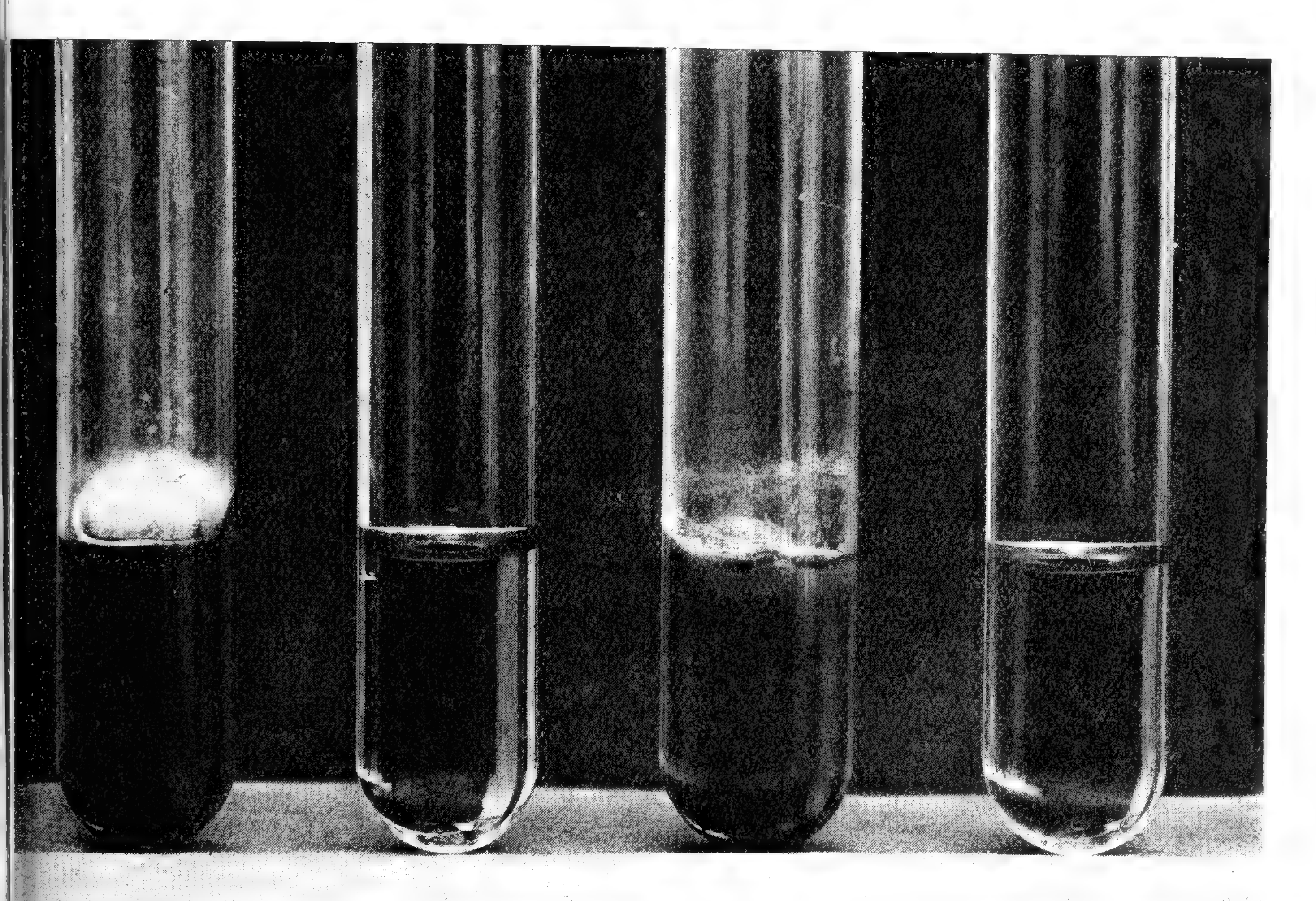
Nous avions utilisé antérieurement, pour un autre emploi, un bouillon préparé au moyen de l'*Amanita muscaria*, hachée et mise en macération à 37° dans son poids d'eau distillée, qui nous a paru convenir à cette démonstration.

Le bouillon a été divisé en deux parties : l'une des portions a été stérilisée à 130°, et l'autre filtrée sur bougie F. Les tubes renfermant ces liquides ont été abandonnés à l'air dans l'étuve à 37°, sans être bouchés. Au bout d'une semaine, les tubes renfermant le bouillon chauffé étaient abondamment recouverts de végétations, tandis qu'aucun micro-organisme ne s'était encore développé sur les tubes non stérilisés par la chaleur,

ainsi que le montre la figure 2. Ce n'est que plus tard qu'ils se sont contaminés.

D'autre part, si, au lieu de recourir à l'infusion de raisins secs, comme dans l'expérience de M. Linossier, nous nous adressons aux extraits de levure de bière ou aux extraits de cuticules de graines, préalablement reconnus comme étant très riches en vitamines et susceptibles de guérir très rapidement

FIGURE 2.



Stérilisé à 130°. Filtré à la bougie. Stérilisé à 130°. Filtré à la bougie.

les troubles nerveux du pigeon carencé, nous pouvons constater qu'après chauffage à 130°, ces extraits perdent complètement toutes leurs propriétés curatives de l'avitaminose. Or les bouillons préparés avec des produits ainsi modifiés par la chaleur ont cependant conservé leur pouvoir excitant de la croissance des champignons.

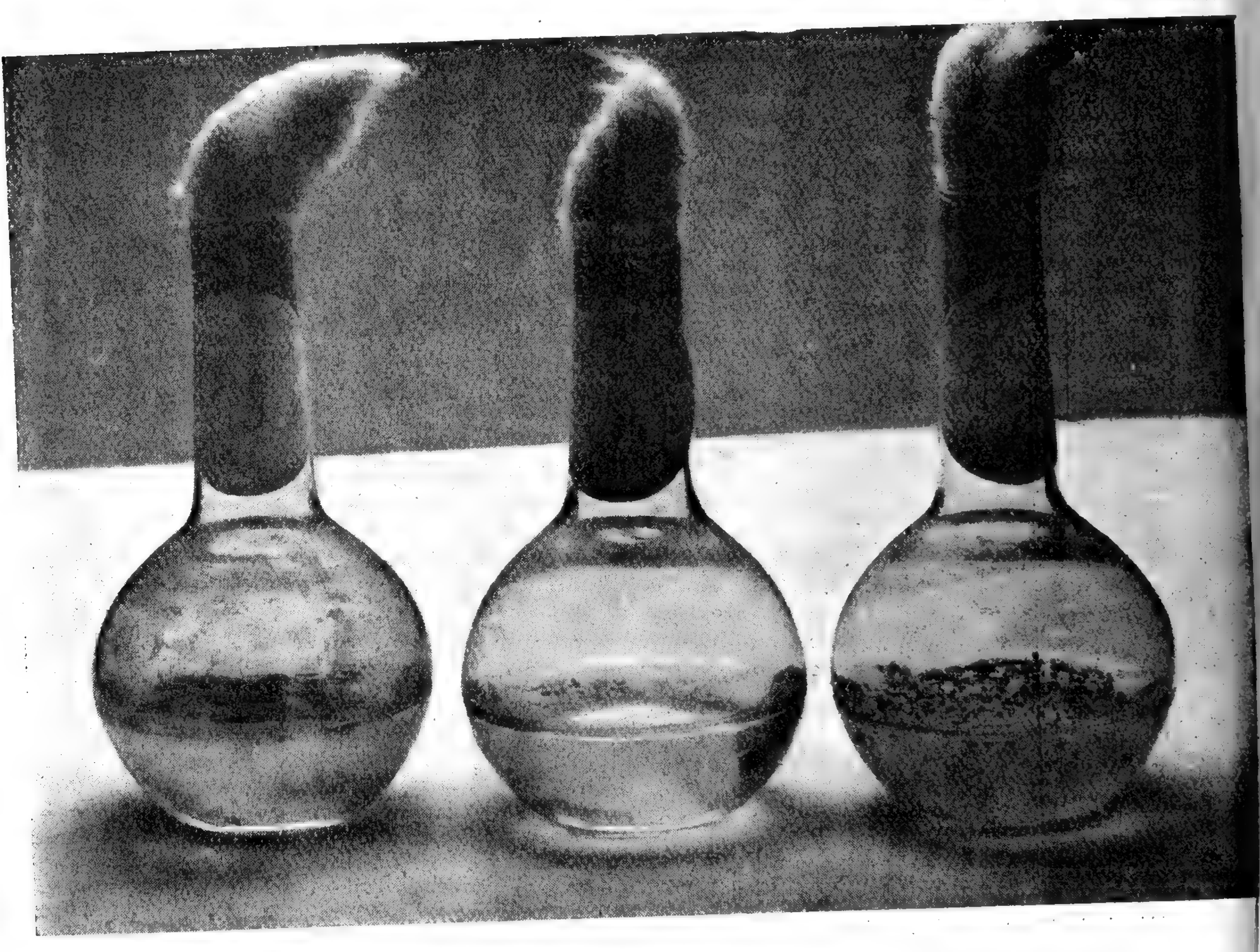
La figure 3 montre l'état de cultures d'*Aspergillus niger* huit jours après l'ensemencement. Le ballon témoin 1 renfermant la solution de tartrate d'ammoniaque et de glycérine ne présente que des traces de végétation, tandis que le ballon 3, dans

lequel ce milieu a été additionné d'extrait de levure de bière, ne contenant plus de vitamines actives pour les animaux, montre une prolifération très abondante du champignon. Comparativement, l'addition d'infusion de raisins secs, ballon 2, est notablement moins favorable au développement de micro-organismes, bien qu'il renferme encore des substances vitaminiques.

Nous avons poussé l'expérience plus loin encore en carboni-



FIGURE 3.



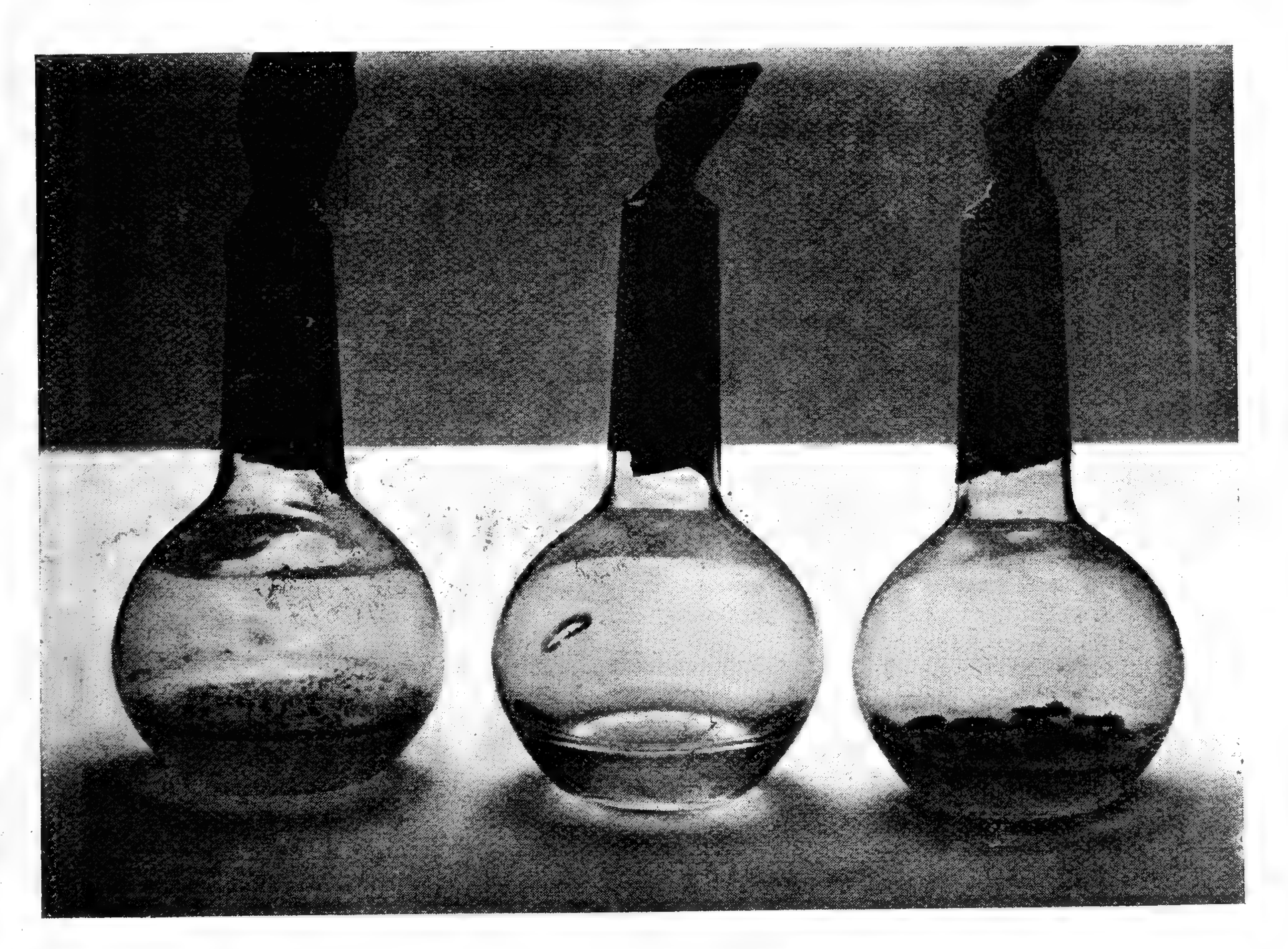
Extrait de levure stérilisé à 135°. — Témoin. — Raisins secs.

sant les extraits de levure et de raisins secs à 250°, et les bouillons qu'ils fournissent, malgré cette profonde altération, sont encore sensiblement aussi actifs que ceux qui renferment les produits frais. Il est bien difficile d'admettre que les vitamines, dont nous connaissons la fragilité, puissent subsister à de telles températures. Nous ne pouvons pas davantage supposer qu'il existe deux classes de ces corps, l'une comprenant les vitamines actives chez les animaux, indispensables au maintien de leur équilibre vital et sensibles à la chaleur, et l'autre,

toute différente comme propriétés, comprenant des substances très résistantes même à 250°, agissant seulement sur la nutrition des végétaux et facilement remplaçables par des composés chimiques définis.

Nous reproduisons ci-dessous (fig. 4), l'état de cultures comparatives d'*Aspergillus niger* développées dans le mélange de tartrate d'ammoniaque et de glycérine, avec et sans addition

FIGURE 4.



Raisins secs. Témoin. Levure carbonisée.

de levure carbonisée. Six jours après l'ensemencement, le ballon témoin n'a presque pas végété, tandis que la mucédinée s'est beaucoup plus abondamment développée dans le liquide auquel on a ajouté un peu de levure carbonisée que dans celui qui a été additionné d'extrait de raisins secs.

On sait d'autre part que l'acide phosphotungstique précipite les vitamines contenues dans les extraits de levure, de cuticule et d'autres cellules et tissus végétaux et animaux.

Après cette précipitation, le liquide résiduel ne renferme

plus de substances actives susceptibles de combattre les accidents de l'avitaminose du pigeon.

Par contre, la fraction phosphotungstique précipitée, traitée par la baryte pour en éliminer les éléments métalliques, libère les substances actives. Or Bottomley, dans ses cultures de *Lemna minor* sur liquide de Detmer, constate que l'extrait

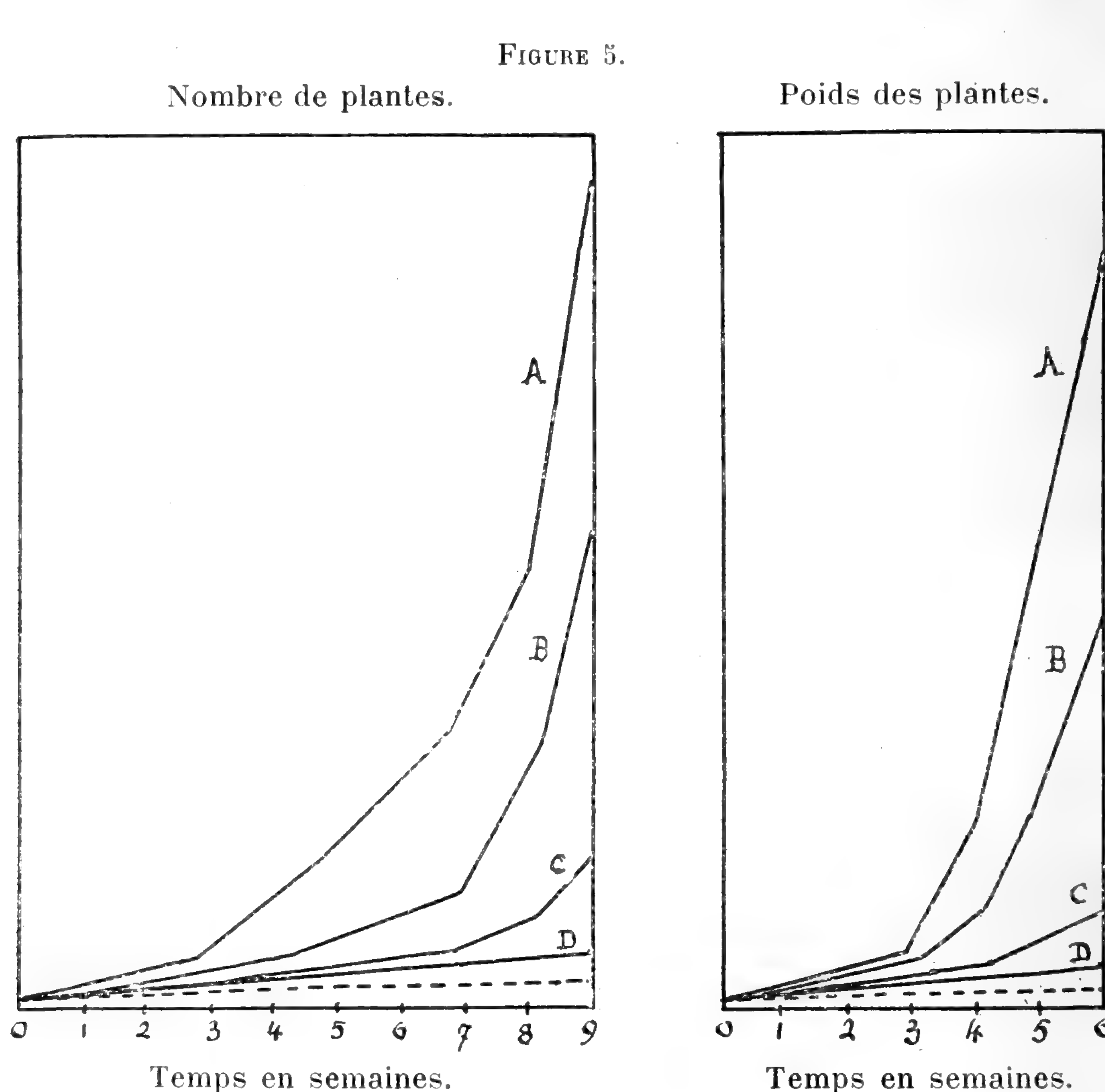
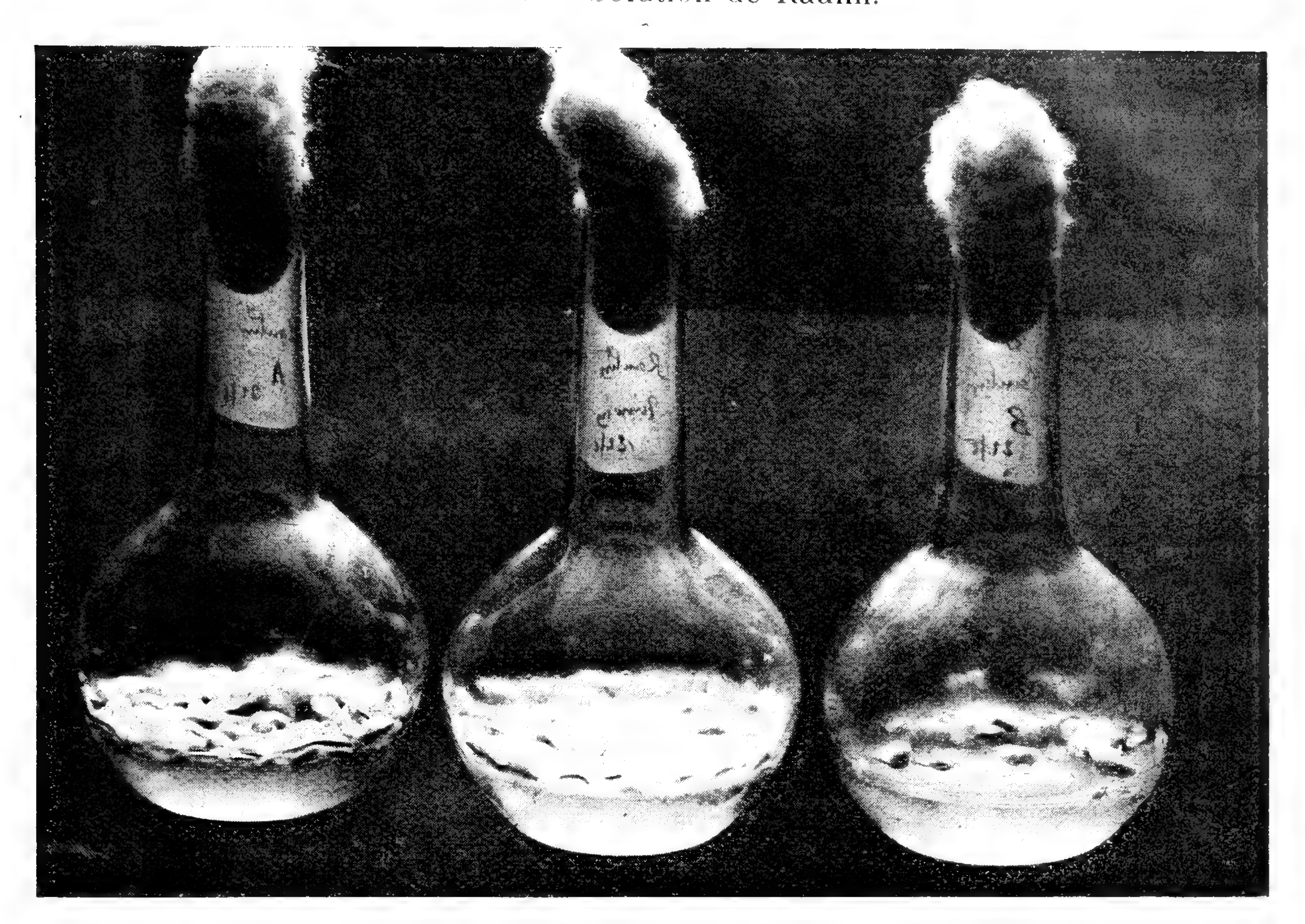


FIGURE 5.

A = Solution de Detmer + extrait aqueux de tourbe bactérisée.
B = — + extrait aqueux de tourbe bactérisée débarrassé d'acide humique.
C = — + extrait alcoolique de tourbe bactérisée.
D = — + fraction phosphotungstique.
- - - - Liquide de Detmer seul.

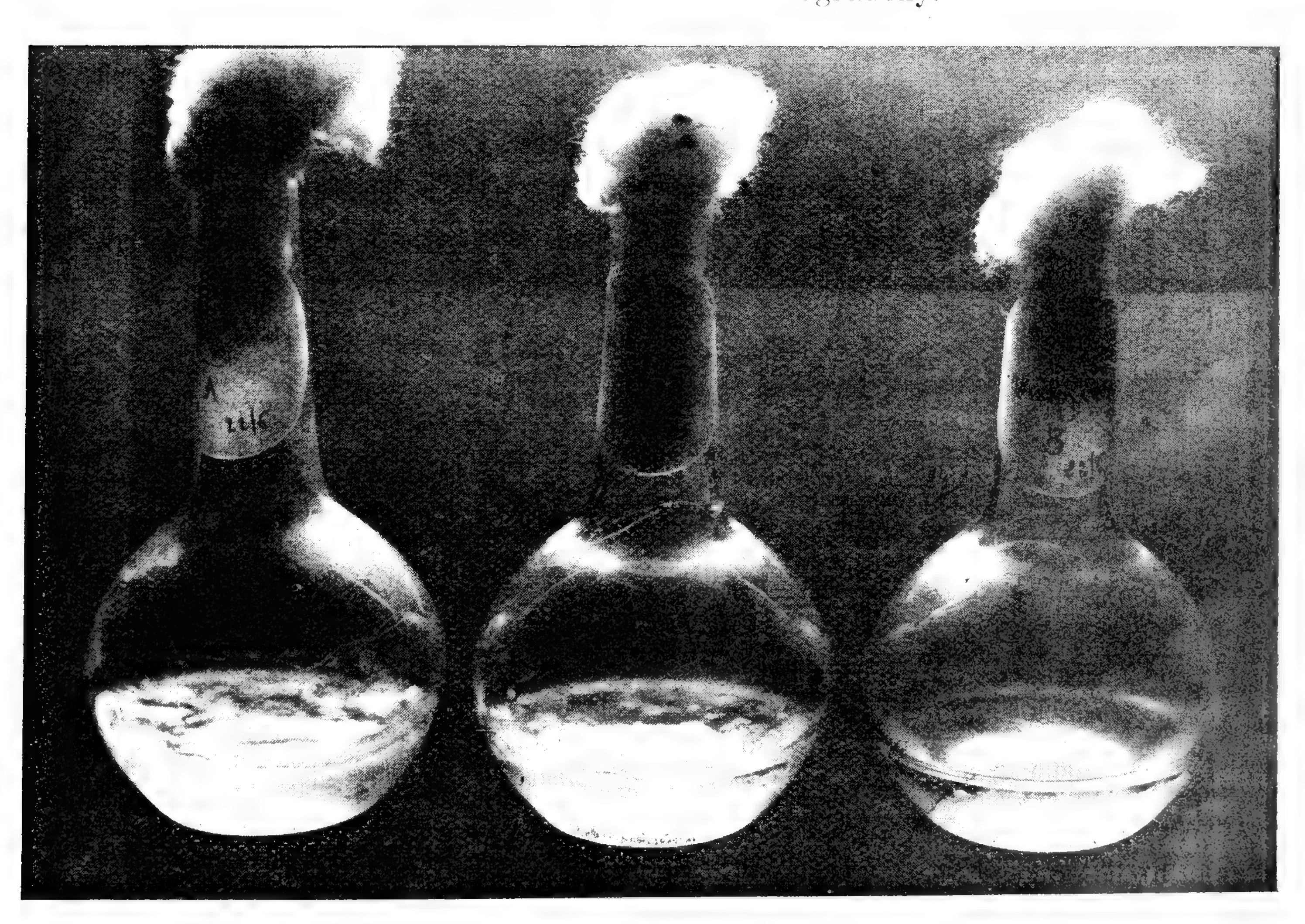
aqueux total de tourbe bactérisée donne des résultats incomparablement supérieurs à ceux que fournit l'emploi de la fraction phosphotungstique ; puisque c'est cette fraction qui renferme seule les agents antibéribériques on peut en conclure que ce ne sont pas ces vitamines qui sont favorables au développement

Fig. 6. — Solution de Raulin.



Portion résiduelle sans vitamines. Témoin. Fraction phosphotungstique riche en vitamines.

Fig. 7. — Solution de Winogradsky.



Portion résiduelle sans vitamines. Témoin. Fraction phosphéotungstique riche en vitamines.

des plantes, mais les autres substances non précipitables par le réactif spécifique des vitamines connues.

Les courbes reproduites ci-dessus (fig. 5), empruntées au travail de Bottomley, viennent précisément à l'appui de cette observation, en montrant que les corps retirés du précipité phosphotungstique ne sont guère plus propices à la multiplication de la *Lemna minor* que le liquide minéral incomplet de Detmer employé sans aucune addition.

Nous avons répété cette expérience sur les moisissures en opérant comme suit :

Un extrait aqueux de levure de bière a été traité par l'acide phosphotungstique, et le précipité recueilli, lavé, décomposé par la baryte, a donné un liquide renfermant les vitamines actives pour les animaux ; la liqueur résiduelle, non précipitable par le réactif et complètement inefficace pour le traitement de la polynévrite des oiseaux, a été recueillie d'autre part, puis ces deux portions ont été ajoutées aux différents milieux artificiels suivants : Liquide de Raulin, Solution de Detmer, Solution de Winogradsky, puis ensemencées comparativement à des témoins avec le *Penicillium glaucum*, l'*Aspergillus niger* et le *Rhizopus nigricans*.

La fraction phosphotungstique, riche en matières curatives de l'avitaminose, ralentit d'une manière constante la végétation, comme on peut s'en rendre compte en examinant les figures 6 et 7.

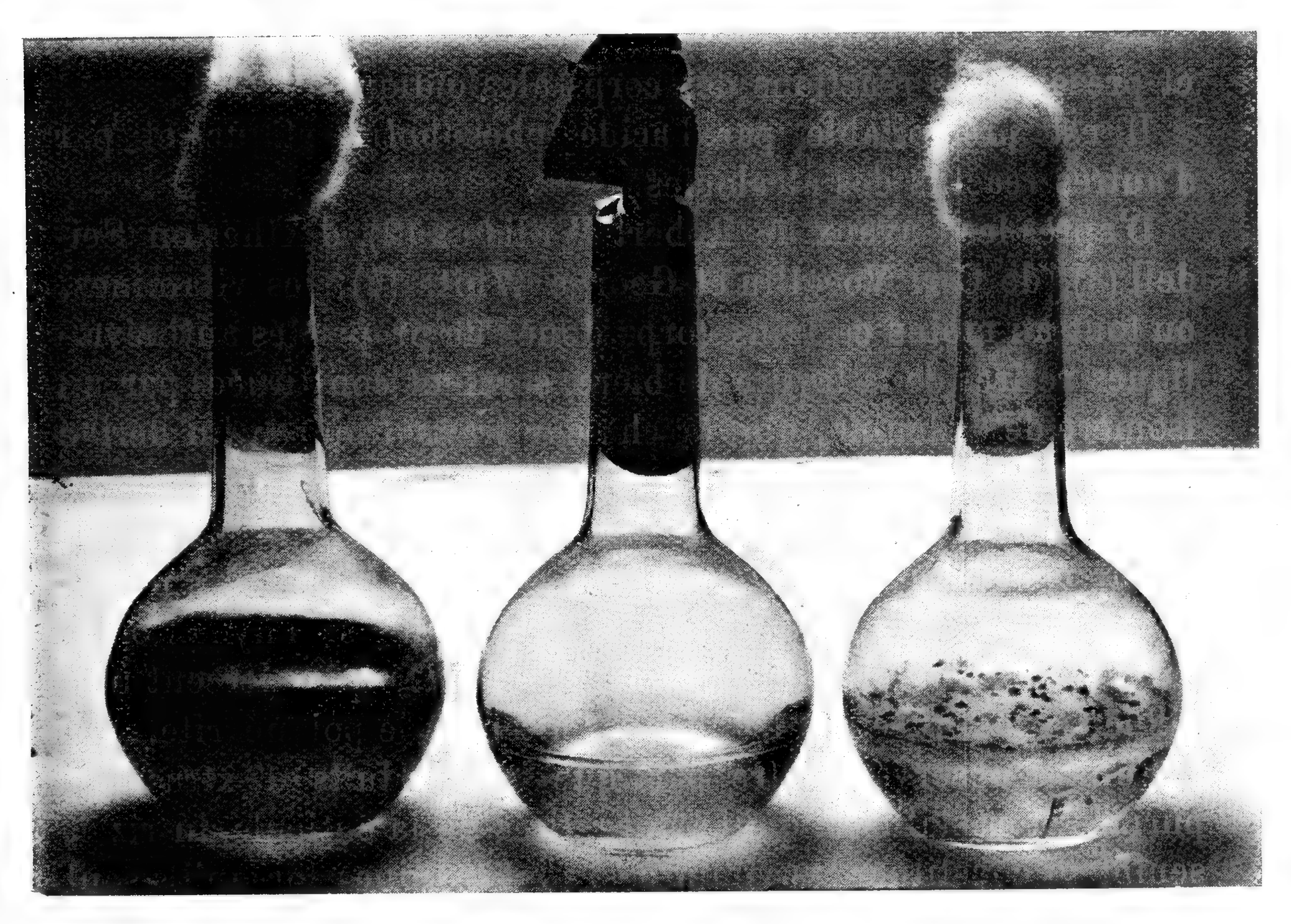
La portion de l'extrait qui renferme les vitamines indispensables aux animaux paralyse le développement des cultures, tandis que l'autre partie, exempte de vitamines, exerce une action variable suivant les milieux employés et les micro-organismes ensemencés; favorisante pour les bouillons pauvres, elle est en général inutile quand elle est ajoutée aux milieux artificiels appropriés.

Les vitamines seraient donc nuisibles au développement des végétaux d'après ces expériences.

Rappelons que, quand on fait passer un extrait vitaminique sur de la terre à foulon (Harden et Silva) ou sur un précipité de silicate d'alumine hydraté, désigné sous le nom de réactif de Lloyd (Seidell), les vitamines sont retenues par les particules insolubles très divisées constituant la mas e argileuse, et le

liquide qui filtre au travers de ces substances est complètement privé de tout corps antinévritique. Partant d'extrait de levure, nous avons ajouté le filtrat ainsi obtenu à la solution de glycérine et de tartrate d'ammoniaque, et nous avons pu nous assurer que, bien que la liqueur ne renferme plus de vitamines, ses propriétés fertilisantes pour les moisissures

Fig. 8. — Aspergillus niger.



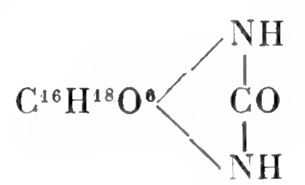
Après filtration. Témoin. Non filtré.

La terre à foulon a retenu une substance nuisible à la végétation, en me temps que les vitamines.

étaient parfaitement conservées, ainsi qu'on peut uger par l'examen des cultures comparatives, reproduit as la figure 8.

Il est à remarquer que la végétation est plus ab dans le liquide qui a été filtré qu'avant son passage terre à foulon. En retenant les vitamines, on a dor iné une substance nuisible et, d'après les expérienc édentes, il semble bien que cette substance nuisible so tamine elle-même.

On sait encore que Funk (1) a isolé de la pellicule argentée qui constitue l'enveloppe du grain de riz, une base pyrimidique, fondant à 233°, qui possède la propriété de guérir les accidents nerveux du béribéri expérimental : ce composé, défini, cristallisé, répond à la formule :



et présente les réactions des corps alcaloïdiques.

Il est précipitable par l'acide phosphotungstique et par d'autres réactifs des alcaloïdes.

D'après les travaux de Robert Williams (2), d'Atherton Seidell (3), de Carl Voegtlin et George White (4), les vitamines, ou tout au moins certains corps doués de propriétés antinévritiques retirés de la levure de bière, seraient constituées par un isomère de l'adénine, que la chaleur transforme en un dérivé tautomérique inactif.

D'autres substances, voisines au point de vue de leurs groupes chimiques fonctionnels, auraient également des propriétés analogues, telles sont certaines oxypyridines, l'hydantoïne, l'allantoïne, l'uracile, la paraxanthine, etc., qui exercent une influence marquée sur les pigeons atteints de polynévrite.

Funk a observé d'autre part que les produits d'extraction, purifiés et cristallisés, qu'il avait retirés de la cuticule du riz et semblent constituer les vitamines, sont toxiques lorsqu'ils sont administrés aux animaux à trop fortes doses.

Toutes ces propriétés, toutes ces considérations chimiques nous amènent à rapprocher les vitamines des alcaloïdes : elles ont d'ailleurs la même origine et, comme nous croyons l'avoir démontré (5), ces corps alcaloïdiques agissent en excitant les

(1) Funk. *Journ of Physiol.*, 1911, 1912, p. 395, 401.

(2) Robert R. Willams. *Journ. of Biol. Chem.*, 1916, p. 437, 445; Washington, U. S. Dep. of Agric. Bureau of. Chem.

(3) Atherton Seidell. *U. S. Publ. Health Reports*, **31**, n° 364.

(4) Carl Voegelin et C. White. *Journ. of Pharmacology and Exper. Therap.*, décembre 1916, p. 155, 166.

(5) Aug. Lumière, Sur les accidents polynévritiques et cérébelleux chez le pigeon soumis au régime du riz décortiqué. *C. R. Acad. de Méd.* 20 janvier 1920. — Sur l'anorexie chez le pigeon nourri au riz décortiqué, et le rôle des vitamines dans la nutrition. *C. R. Acad. de Méd.*, 30 mars 1920. — Sur le rôle des vitamines dans la nutrition. *La Presse Médicale*, 8 mai 1920.

glandes à sécrétion externe et, en permettant l'accomplissement de la phase digestive dans la nutrition, préparent ainsi l'assimilation.

La nature alcaloïdique des vitamines actives pour les animaux explique non seulement leur inutilité pour les plantes, mais même l'effet paralysant qu'elles peuvent exercer sur la végétation lorsqu'elles sont ajoutées à des milieux nutritifs convenables et à dose suffisante.

Il résulte de ces expériences que tous les caractères des vitamines constituant les propriétés spécifiques propres à les définir : indispensabilité, impossibilité de remplacement par des composés chimiques définis, sensibilité à la chaleur, précipitation par l'acide phosphotungstique et par les réactifs des alcaloïdes, absorption par la terre à foulon et le réactif de Lloyd, manquent aux substances qui peuvent, dans des milieux de culture pauvres, insuffisants, et *dans ces milieux seulement*, améliorer la croissance des végétaux.

Ces substances stimulantes occasionnelles ne semblent donc pas pouvoir être assimilées aux vitamines.

L'une des raisons qui les ont fait considérer comme telles provient du fait qu'elles agissent à dose extrêmement faible, et Bottomley accepte ce fait en faveur de sa thèse.

« Il est difficile de comprendre, écrit-il, comment l'addition de quantités de matières organiques aussi petites que 13 parties à une solution de culture contenant déjà 5.500 parties de sels nutritifs minéraux puisse produire les résultats obtenus, si elle ne représente qu'un nouvel apport d'aliments pour les végétaux. »

Or, ce n'est pas par la quantité de produits alimentaires que le milieu minéral choisi par Bottomley (liquide Detmer) se trouve insuffisant, mais par sa pauvreté qualitative, certains éléments minéraux utiles manquant sans doute à la solution employée.

D'ailleurs, d'autres faits plus précis montrent que l'argument de Bottomley ne saurait être retenu.

Raulin a constaté qu'en éliminant le zinc du milieu artificiel qu'il a composé pour la culture de l'*Aspergillus niger*, la récolte de cet organisme, toutes conditions égales d'autre part, n'est plus que le dixième de celle qu'on peut recueillir en laissant

subsister cet élément métallique; or, le poids du zinc renfermé dans un litre de liquide de Raulin n'est que de 0,01 centigr. (0,07 de ZnCl pour 1.500 grammes de solution) alors que le poids total de matériaux nutritifs qui s'y trouvent dissous atteint 53 gr. 37; le zinc qui intervient ne représente donc dans ce poids que 1/5.337 des aliments solides contenus dans la solution, quantité douze fois plus faible que celle qui fait considérer par Bottomley l'extrait de tourbe comme une vitamine, et cependant le zinc ne saurait être assimilé à ces substances!

Dans les expériences de Mazé, le fluor indispensable à l'évolution complète du maïs cultivé en solution purement minérale ne représente que la 1/3.000 partie des sels renfermés dans la liqueur culturale, et le fluorure de sodium ne peut être davantage assimilé à une vitamine.

Le raisonnement de Bottomley, basé sur la petitesse des doses, ne saurait donc être retenu.

Il se peut d'ailleurs que certains éléments, agissant en proportion très minime, interviennent pour améliorer la végétation en paralysant l'effet des toxines sécrétées par les cellules. C'est ce que Mazé a fait ressortir dans son étude sur la chlorose du maïs (1).

En réalité, il est possible, probable même, qu'en offrant à des végétaux des substances déjà élaborées par d'autres végétaux, on facilite, dans certains cas et dans une certaine mesure, l'assimilation de quelques matériaux et on favorise la croissance des plantes qui peuvent disposer d'aliments ainsi préparés; mais ce fait n'autorise pas à considérer ces aliments comme des vitamines, puisqu'ils n'en possèdent aucune des propriétés caractéristiques.

CONCLUSIONS

1° Les vitamines ne sont nullement nécessaires au développement des végétaux, qui peuvent faire leur croissance complète dans des milieux chimiquement définis, et même dans

(1) Mazé, Chlorose toxique du maïs. La sécrétion interne et la résistance naturelle des végétaux supérieurs aux intoxications. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1916, p. 1059.

des solutions purement minérales convenablement choisies.

2° Dans des milieux pauvres et insuffisants pour assurer une abondante et rapide végétation, la fertilisation par des extraits organiques, renfermant des vitamines plus ou moins altérées, ne semble pas due à ces vitamines mêmes, mais aux produits qui les accompagnent.

3° L'addition de ces extraits organiques aux milieux pauvres peut être avantageusement remplacée par l'adjonction de sels minéraux chimiquement définis, tout au moins dans le cas des mucédinées qui ont été utilisées au cours de nos expériences.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Février — N° 2.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — France : **45** francs; Union postale : **55** francs. Prix d'un Numéro : **4** francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

Les annonces sont reçues à l'Économat de l'Institut Pasteur.

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES »

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . . . France . . . . 45 fr.
— — — — . . . . . . Union Postale. 55 fr.
Prix du numéro, — — . . . . 4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées.
Les annees 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément.
Tables des Matières années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 2

LYSOL

LE PLUS PUISSANT DES ANTISEPTIQUES-DÉSINFECTANTS DÉRIVÉS DU GOUDRON

ENTIÈREMENT SOLUBLE DANS L'EAU

Le **LYSOL**, recommandé par les médecins et les savants les plus éminents, est le meilleur préservatif des maladies épidémiques : **Grippe, Influenza, Diphtérie, Fièvre typhoïde, etc.**

Les Dispensaires antituberculeux et, principalement, le Dispensaire modèle de Lille, fondé et dirigé par le Dr Calmette, emploient les **Solutions Lysolées**, de préférence à toutes autres, pour la destruction des germes malfaisants des crachats et du linge des tuberculeux.

Savons de toilette antiseptiques au LYSOL, pour ÉCOLES, CRECHES, DISPENSAIRES, etc.

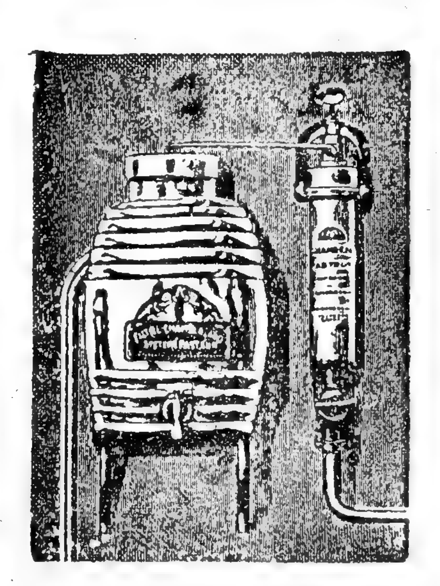
Eau Dentifrice antiseptique au LYSOL

Société Française du LYSOL

65, rue Parmentier, à IVRY (Seine)

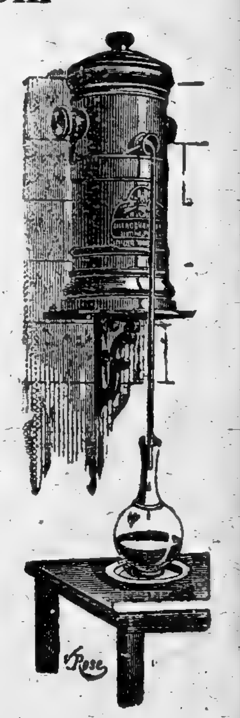
FILTRE CHAMBERLAND SYSTEME PASTEUR

Le seul autorisé par PASTEUR à porter son nom



2 Grands Prix (Exposition Universelle 1900)
5 Diplômes d'Honneur
12 Médailles d'Or ~~~ **Prix Montyon**
Médaille d'Or de la Société d'Encouragement pour l'Industrie Nationale.

Le SEUL pouvant s'opposer efficacement à la transmission des maladies par les eaux de boisson.



FILTRATION DE L'EAU

BOUGIES DE POROSITÉS GRADUÉES POUR LABORATOIRES

Siège social : 58, rue Notre-Dame de-Lorette, PARIS

SOCIÉTÉ D'INSTALLATION ET D'ENTRETIEN

1, Rue Godot-de-Mauroi

(POUR PARIS ET LA BANLIEUE)

35e ANNÉE FÉVRIER 1921 N° 2

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

AVANTAGES DE LA QUININISATION PRÉVENTIVE DÉMONTRÉS ET PRÉCISÉS EXPÉRIMENTALEMENT (PALUDISME DES OISEAUX)

par Étienne et Edmond SERGENT.

Malgré les succès remportés par la quininisation préventive contre le paludisme, l'ère des discussions entre médecins à ce sujet n'est pas close.

La meilleure façon de juger la valeur de la prophylaxie quinique consistera à faire passer la question du domaine de l'observation simple dans celui de l'expérimentation.

Nous poserons ainsi le problème : soit un homme sain, introduit dans un pays où sont réunies les conditions nécessaires de l'infection palustre : anciens infectés porteurs de germes, anophélines, saison et température favorables.

La quinine, absorbée avant l'inoculation des sporozoïtes par la trompe du moustique, suffit-elle à empêcher la contamination de l'organisme ?

Pour répondre à cette question, les expériences nécessitent :

1° L'emploi d'un virus de virulence fixe, capable de reproduire à coup sûr la maladie, avec des symptômes constants ;

2° Des sujets indemnes et sensibles, en nombre illimité.

Ces deux conditions rendent impossible l'expérimentation sur l'homme.

Le paludisme humain n'étant pas transmissible aux animaux, on a recouru, pour l'expérimentation, à une infection présentant les plus grandes analogies avec le paludisme humain. C'est l'infection des passereaux due au *Plasmodium relictum* (*Proteosoma*), qui a servi à R. Ross pour sa découverte du rôle des moustiques dans la transmission du paludisme.

Les moineaux algériens fournissent le virus.

L'agent de transmission est le *Culex pipiens*.

Les sujets indemnes et sensibles sont des canaris nés en cage et conservés dans des cages grillagées dans un laboratoire également grillagé.

L'exposé comprendra 4 parties :

I. — Infection expérimentale aiguë chez les sujets neufs.

II. — Passage à la chronicité : infection latente et immunité relative.

III. — Action curative de la quinine sur l'infection à *Plasmodium*.

IV. — Action préventive.

I. — Infection expérimentale aiguë des canaris par le Plasmodium.

Virus. — Le virus provient du moineau algérien. Il se trouve que les canaris achetés à Alger depuis dix-huit ans sont sensibles dans l'immense majorité des cas : 996 sur 1.000. Le virus est conservé au moyen de passages par canaris.

Il a établi (1) que la technique sûre pour les inoculations est l'injection *dans le péritoine* de sang parasité (1 ou 2 gouttes dans de l'eau citratée). Pour avoir un virus à son maximum de virulence, on pratique les inoculations avec du sang contenant un parasite au moins par champ d'objectif à immersion (on compte parfois jusqu'à 80 parasites par champ). Pour chaque série d'inoculations d'épreuve, deux oiseaux au moins servent de témoins.

(1) ETIENNE SERGENT et Miss H. HEMPL. *Bull. Soc. Path. exot.*, **10**, 11 juillet 1917, pp. 550-552.

Le paludisme des oiseaux peut se contracter autrement que par la piqûre du moustique ou par l'inoculation du virus sanguin. On a déjà vu que l'infection à *Plasmodium* peut être transmise par frottis de sporozoïtes sur la peau plumée et aussi par injection de sang dans le rectum (1).

L'infection peut aussi être obtenue par simple application de sang parasité sur la peau légèrement scarifiée : deux canaris ont contracté, de cette façon, une infection normale.

TABLEAU DE L'INFECTION SANGUINE CHEZ LE CANARI INOCULÉ.
(d'après l'observation de plus de 1.000 canaris).

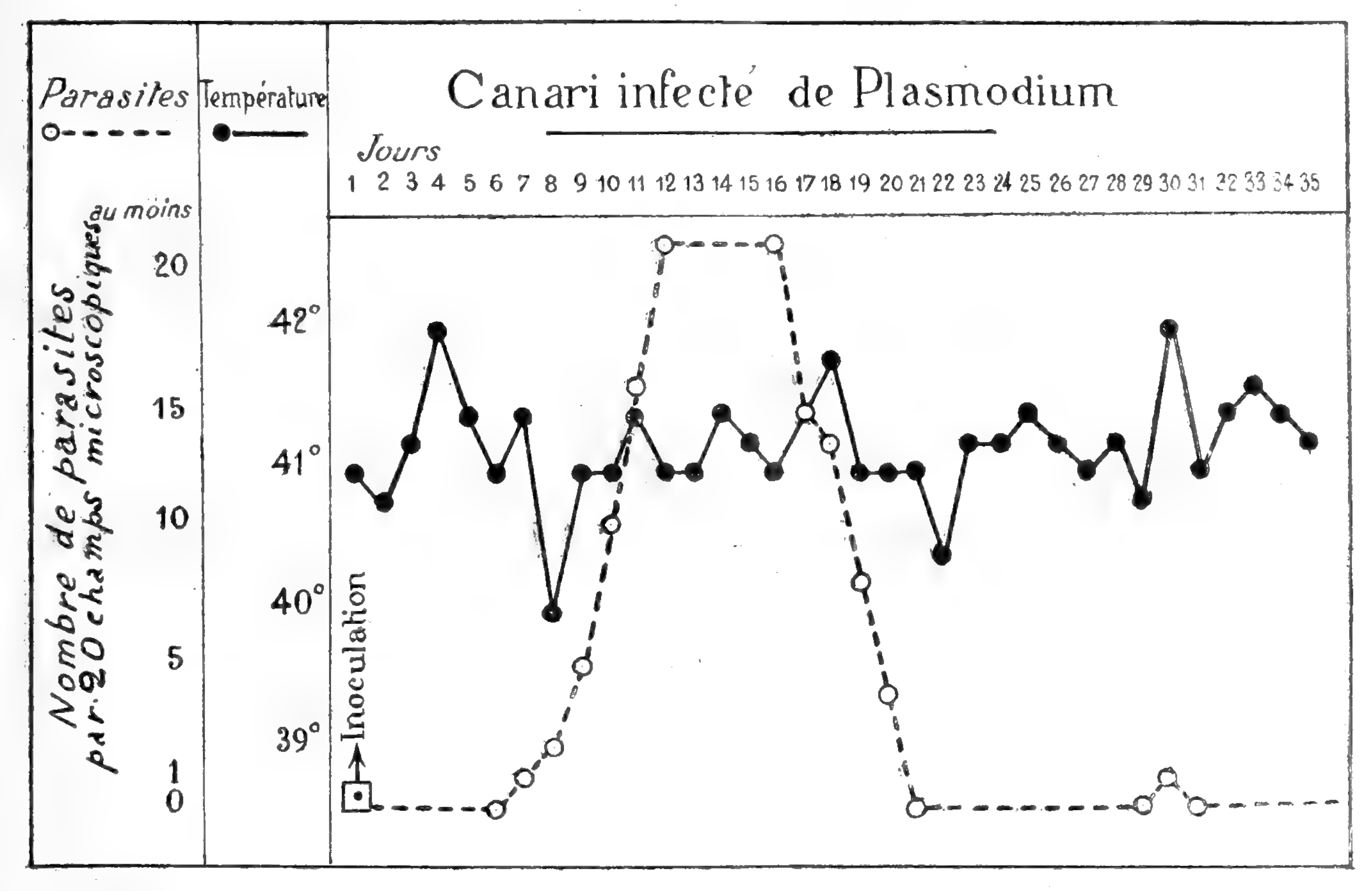


FIGURE 1.

1° *Incubation.* — Les parasites apparaissent dans le sang après 3-10 jours.

2° *Phase aiguë.* — A. Ils augmentent de nombre en 1-5 jours;

B. Les parasites sont très nombreux vers le neuvième ou le dixième jour après l'inoculation, restent nombreux (de 1 à 80) par champ d'objectif à immersion (2), 5 jours consécutifs en moyenne (minimum 1 jour, maximum 27 jours);

C. Ils diminuent de nombre jusqu'à disparaître du sang périphérique en 3-6 jours.

(1) EDM. et ET. SERGENT. Ces *Annales*, 32, août 1918, pp. 382-388.
(2) Jusqu'à quatre parasites dans une seule hématie

Durée totale de la phase aiguë : 9 jours en moyenne (minimum 3 jours, maximum 29 jours).

3° *Mortalité* pendant la phase aiguë : elle atteignait 61,37 p. 100 en 1914.

Elle est, avec le même virus, de 30 p. 100 en moyenne, sur plusieurs centaines de sujets, en 1914-1920.

Technique de l'examen du sang. — Le sang des oiseaux en expérience est examiné tous les jours : il est prélevé à la veine de l'aile, à l'aide d'une épingle fine entomologique ; pour éviter la contamination d'oiseau à oiseau, l'épingle est chaque fois essuyée sur du coton imbibé d'alcool. Les parasites sont comptés par champ d'objectif à immersion homogène (1/15 Stiassnie).

Symptomatologie.

Température. — La température normale d'un canari oscille entre 40° et 43°, elle ne présente pas d'élévation vespérale

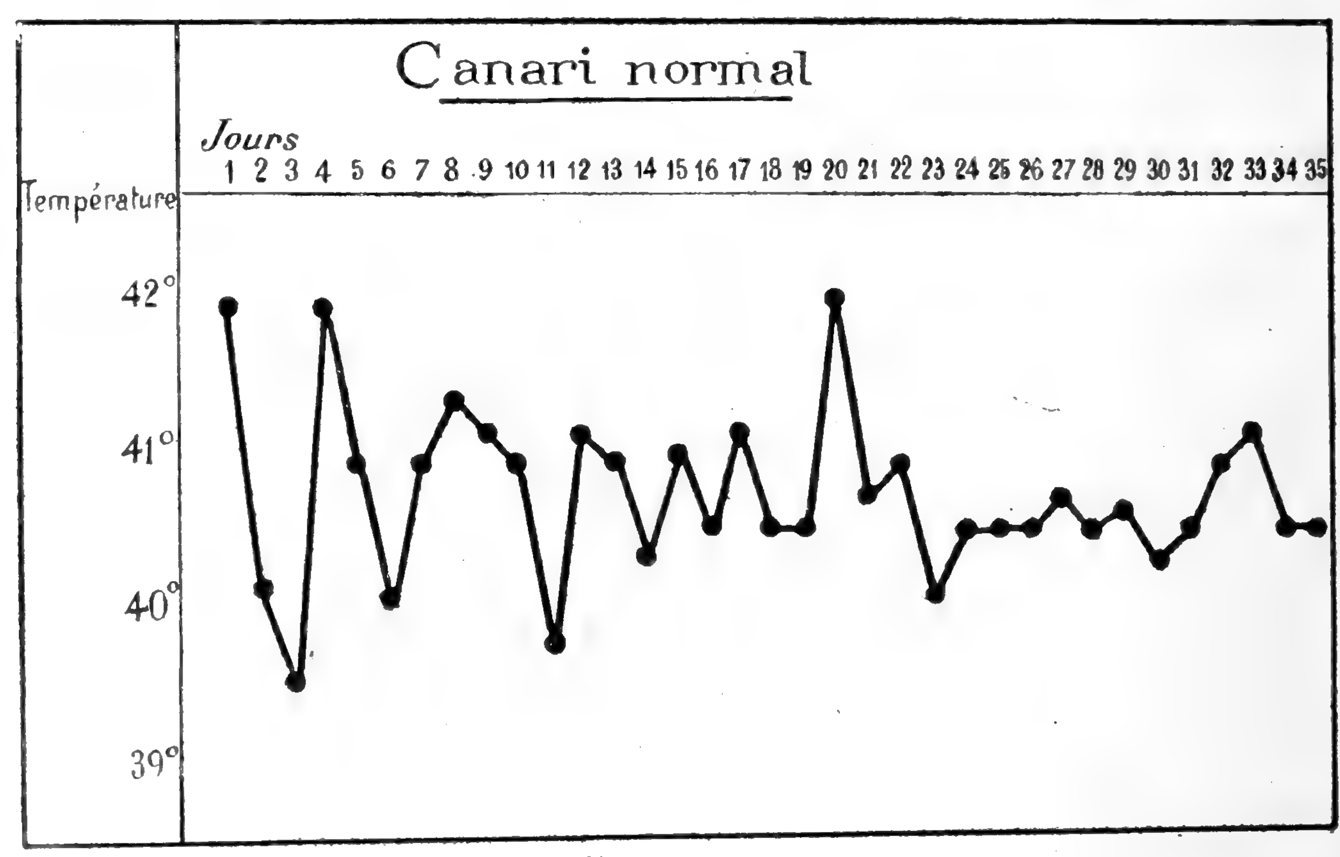


Figure 2.

nette (fig. 2). Comme l'oiseau est très émotif, on peut constater, à dix minutes d'intervalle, des écarts de température de 8/10 de degré. Dans le paludisme des oiseaux, la courbe de la température ne donne aucune indication sur la marche de la maladie, la température est la même qu'à l'état normal (1).

(1) Pour apprécier la température interne des passereaux, il est préférable de placer le thermomètre dans l'œsophage plutôt que dans le rectum de

Accès pernicieux. — Lorsque l'infection est très intense, le canari « se met en boule » et reste au bas de la cage, durant les quelques jours qui précèdent la mort. On note de l'amaigrissement et de la décoloration du sang.

Splénomégalie. — L'hypertrophie de la rate est considérable :

Dimensions de la rate d'un canari normal : 3 ou 4 mm. × 2 mm. (en moyenne).

Dimensions de la rate d'un canari mort d'accès pernicieux : 15 mm. × 5 mm. (au maximum).

Poids moyen de la rate d'un canari normal : 19 milligrammes.

Poids de la rate d'un canari mort d'accès pernicieux : jusqu'à 1 gramme.

II. — **Passage de l'infection à la chronicité. Infection latente et immunité relative**

Les canaris qui survivent à l'infection aiguë (70 p. 100) conservent toujours une infection chronique : les parasites disparaissent du sang périphérique, mais le sang reste infectant pendant plusieurs mois (au moins 4 mois) ou pendant des années. Au cours de cette infection chronique, des rechutes très légères peuvent survenir, sans aucune régularité. La rate reste grosse et de couleur foncée. Mais le canari présente toutes les apparences d'un parfait état de santé.

Si, dans l'intervalle des rechutes, on réinocule au canari un virus sûrement infectant pour les témoins, on ne voit pas apparaître en général de parasites dans le sang périphérique ; ou bien ils se montrent très rares, un ou deux jours après la réinoculation. L'infection latente est donc accompagnée d'un état d'immunité relative. C'est l'acclimatement des « vieux colons » en pays fiévreux. Cette immunité relative est acquise dès la phase aiguë. On l'a vu persister deux ans et demi (dans 4 cas sur 5) (1).

l'oiseau : le mercure monte beaucoup plus vite et l'oiseau paraît supporter ce procédé beaucoup mieux. L'instrument doit être enfoncé jusqu'au sternum.

(1) Etienne Sergent et Miss Hempl. *Loc. cit.*

Diagnostic de l'infection latente.

L'infection latente des oiseaux peut être décelée par les moyens suivants, classés par ordre de valeur :

1° *Réaction d'immunité.* — C'est le procédé le plus sûr. On injecte du sang parasité dans le péritoine de l'oiseau suspect : s'il ne présente pas, comme les témoins, une forte infection, c'est qu'il est encore impaludé (qu'il est « acclimaté ») (20 cas positifs sur 20).

2° *Isodiagnostic.* — Nous proposons d'employer ce terme pour désigner la réaction suivante : le sang de l'oiseau suspect, injecté dans le péritoine d'oiseaux neufs de même espèce, leur transmet l'infection à hématozoaires. Bon procédé, qui a l'avantage sur le premier de ne pas introduire de virus dans le sang de l'oiseau en observation (16 cas positifs sur 17). Si un canari A, utilisé pour l'isodiagnostic, c'est-à-dire ayant reçu dans le péritoine le sang d'un oiseau suspect, donne une réponse négative, ce résultat peut, à son tour, être contrôlé par un nouvel isodiagnostic secondaire : on inocule dans le péritoine d'un autre canari neuf B le sang du canari A.

3° *Xénodiagnostic* (de Brumpt). — Des *Culex*, à qui l'on fait sucer le sang de l'oiseau suspect, s'infectent. Pas de résultat constant. Le xénodiagnostic peut être complètement négatif, alors que le sujet réagit comme un « acclimaté » à l'inoculation d'épreuve (26 cas positifs sur 35).

4° Un procédé beaucoup moins sûr encore consiste à *provoquer une rechute.* Chez 3 canaris impaludés, sans parasites dans le sang périphérique, nous n'avons pas obtenu régulièrement de rechutes, ni par la chaleur (exposition à + 37° pendant douze jours consécutifs), ni par le froid (exposition à une température inférieure à 0° pendant trois jours consécutifs), ni par les douches froides, ni par l'injection de sang humain ou de sang de souris.

5° *Splénodiagnostic.* — A l'autopsie, l'hypertrophie de la rate est un indice précieux, car elle est constante chez l'oiseau impaludé, mais le splénodiagnostic ne peut être établi qu'après la mort.

III. — Action curative de la quinine sur le Plasmodium.

Le chlorhydrate de quinine a été employé en solution très étendue : 1 gramme pour 500 cent. cubes d'eau distillée; le médicament était injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané.

On a cherché la dose maxima supportée par l'organisme, puis la dose minima efficace contre le *Plasmodium*. Enfin on a étudié l'action de la quinine sur la lésion la plus apparente que cause le paludisme chez les oiseaux : la splénomégalie.

1° Toxicité de la quinine pour le canari.

Pour se rendre compte de la résistance de l'oiseau à la quinine, des doses décroissantes ont été injectées, en partant d'une dose sûrement mortelle.

Dose mortelle. — Elle est très variable pour le canari, comme pour l'homme. Le canari peut supporter des doses élevées : plusieurs semaines de suite des doses quotidiennes de 0 milligr. 7, correspondant, pour un homme de 65 kilogrammes, à 2 gr. 25 environ, et, plusieurs jours de suite, des doses de 2 milligr. correspondant à 6 gr. 50 (sous la peau) (1). Une seule injection sous-cutanée de 4 milligrammes de quinine a déterminé la mort presque immédiate de quatre canaris sur cinq ; la dose de 3 milligrammes a été mortelle pour un autre canari ; avec 2 milligrammes, mort rapide de deux canaris sur quatre (très parasités, il est vrai).

Au contraire, quatorze canaris ont bien supporté des doses de 2 à 4 milligrammes quand elles ont été administrées par doses fractionnées (en 2 ou 3 injections par jour).

Donc, une dose unique *pro die* de 2 à 4 milligrammes de quinine peut être mortelle pour un canari. Si l'on fractionne cette dose, l'oiseau résiste.

2° Action de la quinine sur le *Plasmodium*.

Pendant la période aiguë.

Si, dès l'apparition des parasites en grand nombre, par

(1) Le poids moyen d'un canari est de 20 grammes.

exemple 1 par champ d'immersion, on injecte de la quinine, on voit les parasites diminuer rapidement de nombre et disparaître en quelques jours. On abrège ainsi la période aiguë.

A. *Forte dose fractionnée. Doses de quinine et mode d'administration.* — 12 canaris très infectés reçoivent sous la peau des doses de quinine variant de 2 milligrammes, 5 à 4 milligrammes, en 2 ou 3 fois le premier jour : en vingt-quatre

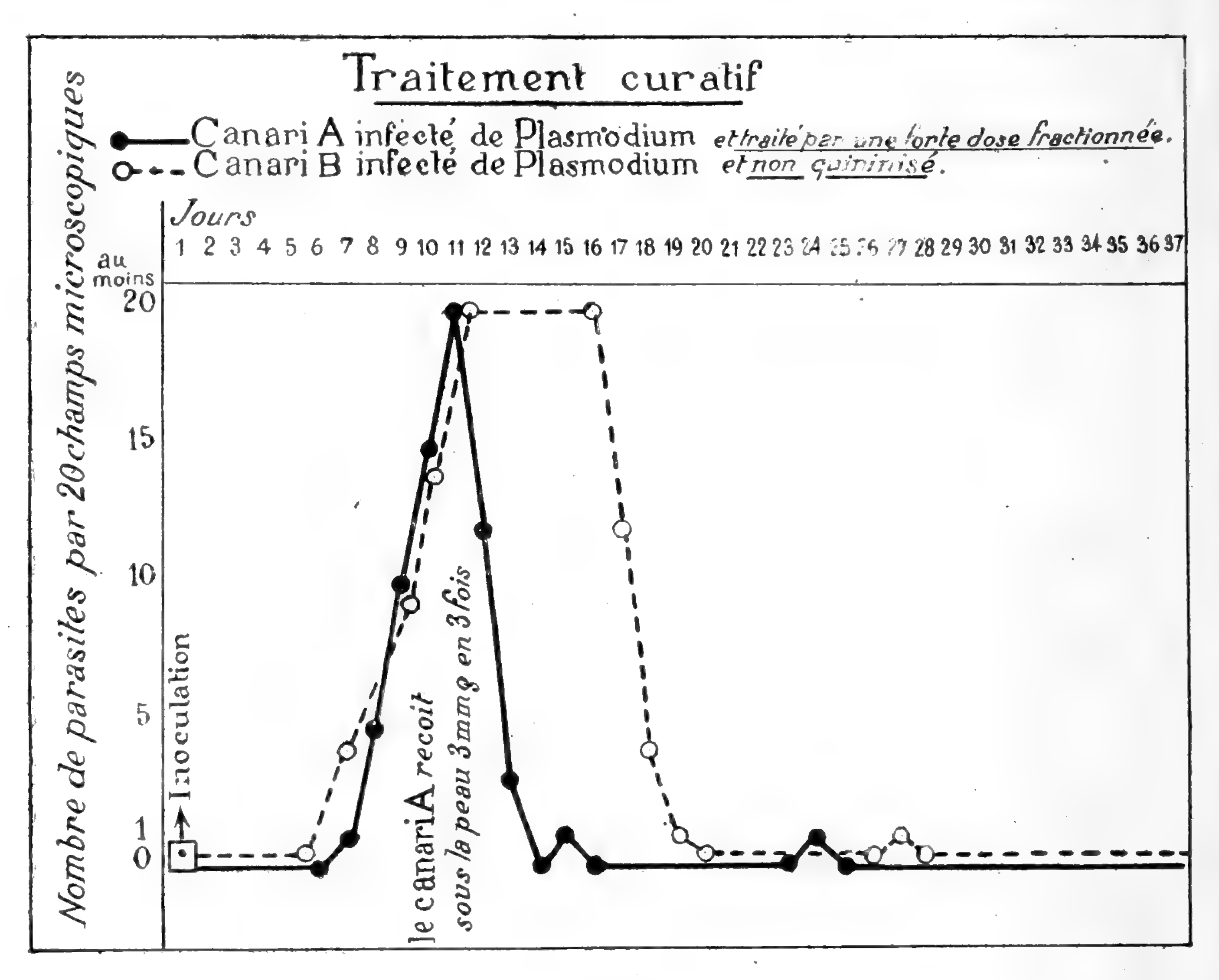


FIGURE 3.

heures, chez 8 de ces oiseaux, les *Plasmodium* diminuent rapidement de nombre(de 1 par champ d'objectif à immersion, leur proportion tombe à 1-12 pour 20 champs). Pour 3 de ces 12 sujets, il a fallu une deuxième série d'injections de quinine (2 milligr. 8 en 3 fois) le lendemain, pour obtenir la diminution du nombre des parasites. Le douzième est resté très infecté, réfractaire à la quinine.

Donc, *avec des doses fortes fractionnées*, dans 11 cas sur 12, la quinine a fait disparaître les parasites du sang périphérique, en moins de quarante-huit heures (fig. 3).

B. *Forte dose unique.* — Dans une deuxième série d'expériences, 11 canaris très infectés reçoivent de 2 milligr. 5 à 4 milligrammes de quinine en une seule fois ; 7 en meurent aussitôt. Des 4 qui résistent, 3 ont encore, deux jours après, de nombreux parasites (au moins 1 par champ) ; 1 seul a son infection réduite comme par les doses fractionnées.

Donc, *avec les doses fortes inoculées en une seule fois*, dans

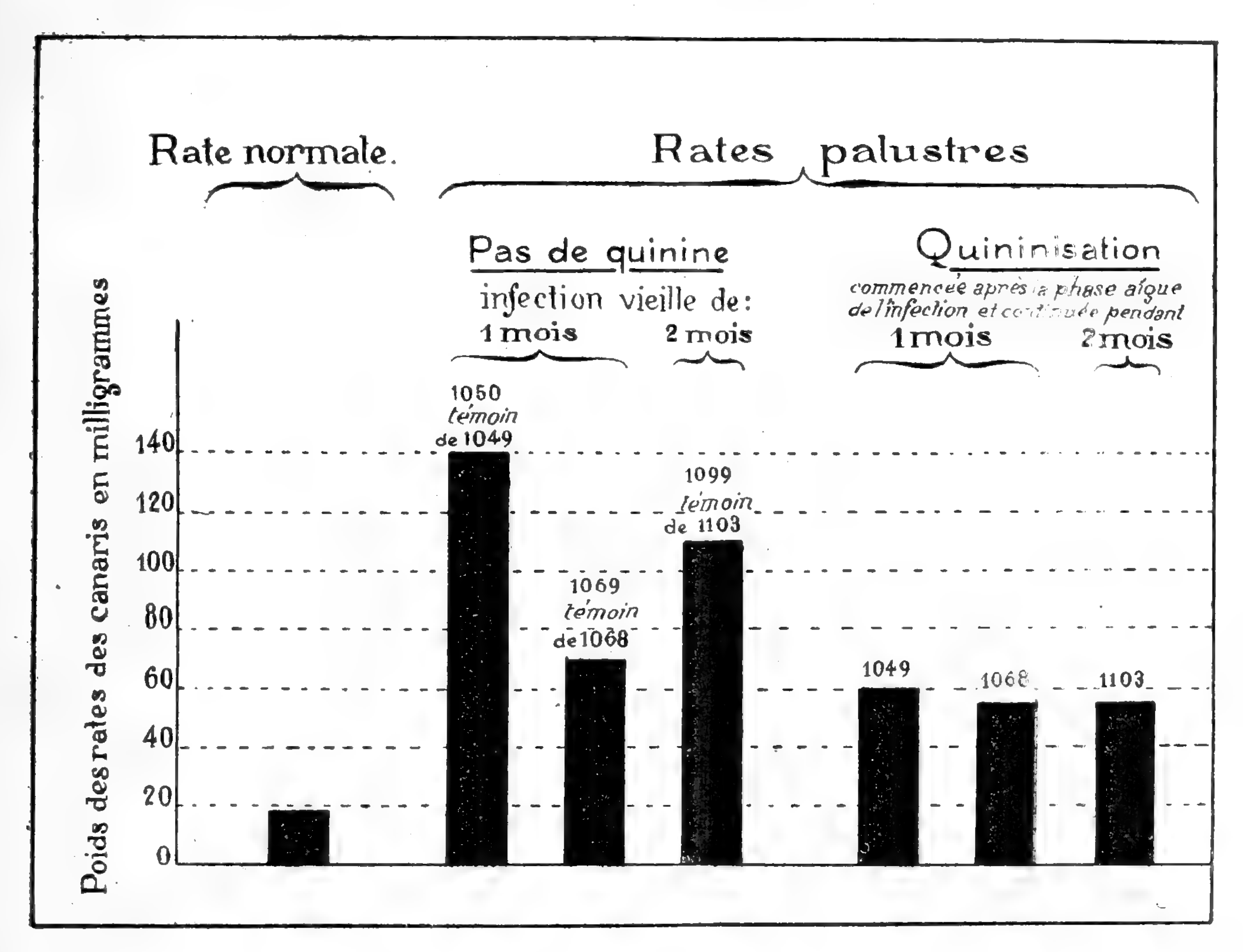


FIGURE 4.

1 cas seulement sur 11, la quinine a fait disparaître les parasites du sang périphérique en moins de quarante-huit heures.

On peut conclure de ces observations : pour que la quinine agisse sur le *Plasmodium* des oiseaux, il faut employer plus de 2 milligrammes, en moins de quarante-huit heures. Cette dose est sub-mortelle, si l'injection est massive. Mais elle est supportée, si elle est injectée par fractions.

3° ACTION DE LA QUININE QUOTIDIENNE SUR LA SPLÉNOMÉGALIE.

Dans le paludisme des oiseaux, l'hypertrophie de la rate peut atteindre des proportions énormes.

Six canaris, inoculés le même jour avec le même virus, montrent une infection identique, au même moment : même intensité et même durée. Dès que les parasites ont disparu du sang périphérique, 2 de ces canaris sont soumis à une quininisation quotidienne à la dose de 0 milligr. 7 pendant un mois, et un troisième pendant deux mois. Au bout de ce laps de temps, l'isodiagnostic est pratiqué pour les 6 oiseaux. Ils sont sacrifiés, leurs rates sont mesurées et pesées. (La rate d'un canari normal mesure en moyenne 3 ou 4 millimètres × 2 millimètres, elle pèse en moyenne 19 à 20 milligrammes) (fig. 4).

Quininisation quotidienne par 0 milligr. 7 pendant un mois.

1° **N° 1049**. — Au bout d'un mois, le sang de 1049 est encore infectant, comme celui de son témoin 1050 (isodiagnostics positifs pour tous les deux). Mais la rate de 1049 *est plus petite et plus légère que celle du témoin* 1050 :

Rate de 1049 : 10 mm. × 2 mm. Poids : 59 milligrammes.

Rate du témoin 1050 : 15 mm. × 3 mm. Poids : 138 milligrammes.

2° **N° 1068**. — Au bout d'un mois, le sang de 1068 est encore infectant, comme celui de son témoin 1069 (isodiagnostics positifs pour les deux). Mais l'infection provoquée par l'injection du sang de 1068 *est très faible* et la rate de 1068, *quoique de même taille que celle du témoin* 1069, *est plus légère* :

Rate de 1068 : 10 mm. × 2 mm. 5. Poids : 56 milligrammes.

Rate du témoin 1069 : 10 mm. × 2 mm. 5. Poids : 70 milligrammes.

Quininisation quotidienne par 0 milligr. 7 pendant deux mois.

3° **N° 1103**. — Au bout de deux mois, le sang de 1103 est encore infectant, comme celui de son témoin 1099 (isodiagnostics positifs pour tous les deux). La rate de 1103 *est plus petite et plus légère que celle du témoin* 1099 :

Rate de 1103 : 11 mm. × 2 mm. 5. Poids : 56 milligrammes.

Rate du témoin 1099 : 14 mm. × 3 mm. Poids : 112 milligrammes.

Conclusion : Dans ces 3 cas, la quinine quotidienne n'a pas guéri complètement l'infection à *Plasmodium*, puisque les rates sont encore hypertrophiées et que le sang des oiseaux est encore infectant, comme le démontre leur isodiagnostic, mais l'action de la quinine sur la dimension et le poids de la rate est manifeste :

« La quinine fait fondre la rate. »

IV. — Action de la quinine préventive.

Comme dans les expériences précédentes, le chlorhydrate de quinine a été employé en solution très étendue : 1 gramme

pour 500 cent. cubes d'eau distillée; le médicament était injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané.

I. — On a recherché les doses maxima dont l'organisme du canari peut supporter l'injection répétée quotidiennement.

II. — On a étudié l'action de ces doses répétées sur la prévention de l'infection à *Plasmodium*.

III. — On a terminé par l'étude expérimentale de l'action préventive de fortes doses données deux jours de suite tous les septième et huitième jours.

1° Fixation de la dose a employer.

On a vu que la dose maxima de quinine que tolère un canari varie entre 2 et 4 milligrammes.

Pour déterminer la dose qui peut être *répétée tous les jours*, on a commencé par essayer celle de 1 milligramme.

Quininisation quotidienne à 1 milligr. à partir du jour de la première inoculation.

N° 1004. — Quininisé tous les jours pendant un mois après l'inoculation: Reste indemne.

N° 1005. — Quininisé tous les jours pendant vingt-cinq jours après l'inoculation : Reste indemne.

N° 1007. — Quininisé tous les jours pendant vingt-cinq jours après l'inoculation : Rares parasites pendant sept jours.

N° 1011. — Quininisé tous les jours pendant vingt-cinq jours après l'inoculation : Reste indemne.

N° 1012. — Quininisé tous les jours pendant vingt-cinq jours après l'inoculation: Très rares parasites pendant un seul jour.

Mais les 5 canaris meurent tous intoxiqués au bout de 25 à 30 jours.

Donc la dose de 1 *milligramme répétée tous les jours*, efficace contre le *Plasmodium*, est toxique pour le canari.

On a donc expérimenté des doses inférieures à 1 milligramme : 0 milligr. 7 et 0 milligr. 5. Elles ont été supportées pendant des semaines et des mois par l'organisme des canaris. La dose de 0 milligr. 7 correspond, pour un homme pesant 65 kilogrammes, à 2 gr. 25 de chlorhydrate environ.

2° Action des doses répétées de 0 milligr. 5 et 0 milligr. 7 injectées préventivement.

33 canaris ont été inoculés avec le même virus. Sur ce nombre, 16 ont été conservés comme témoins, 17 ont été traités préventivement.

Infection des témoins. — On voit du quatrième au douzième jour les parasites affluer dans le sang avec une régularité parfaite. Entre le dixième et le quinzième jour le sang contient un parasite au moins par champ d'immersion, 3 canaris sur 16 meurent de leur infection.

Canaris témoins (inoculés avec le même virus que les oiseaux quininisés).

Nos				
1130.	Paras. apparaissant le	7e jour.	Paras. *très nombreux*	du 9e au 11e jour.
1131.	—	7e —	—	9e au 12e —
1103.	—	7e —	—	8e au 11e —
993.	—	6e —	—	9e au 15e —
				Mort le 15e —
994.	—	7e —	—	11e au 14e —
1008.	—	6e —	—	8e au 13e —
1026.	—	4e —	—	5e au 6e —
				Mort le 8e —
1027.	—	7e —	—	8e au 9e —
				Mort le 9e —
1038.	—	6e —	—	7e au 21e —
1039.	—	8e —	—	8e au 11e —
1111.	—	11e —	—	12e au 17e —
1112.	—	12e —	—	6e au 7e —
1088.	—	10e —	—	11e au 17e —
1087.	—	9e —	—	11e au 14e —
1057.	—	7e —	—	8e au 13e —
1058.	—	5e —	—	9e au 13e —

3 morts sur 16.

I. — Doses répétées de 0 milligr. 5.

Quininisation quotidienne à 0 milligr. 5 à partir du jour de la première inoculation.

No 990. — Quininisé tous les jours pendant treize jours après l'inoculation : Très rares parasites pendant cinq jours.

No 991. — Quininisé tous les jours pendant trente jours après l'inoculation : Très rares parasites pendant trois jours.

No 992. — Quininisé tous les jours pendant treize jours après l'inoculation : Très rares parasites pendant quatre jours.

L'injection de 0 milligr. 5 répétée quotidiennement à 3 canaris a empêché l'infection d'être très intense. Les parasites, au lieu d'être nombreux, n'ont jamais été que très rares.

II. — Doses répétées de 0 milligr. 7.

A. — *Quininisation tous les jours à 0 milligr. 7 pendant un temps égal à celui de la phase aiguë chez les témoins* (de dix à trente jours).

Après ce temps : 1° Un canari ne reçoit plus de quinine.

2° Huit canaris ne reçoivent de quinine que tous les deux jours pour éviter l'intoxication de l'organisme.

B. — *Quininisation faite d'emblée tous les deux jours à partir du jour de l'inoculation.*

A. — 1° *Quininisation quotidienne à* 0 *milligr.* 7 *pendant dix jours seulement après l'inoculation, puis arrêt de la quininisation.*

N° 1022. — Quininisé tous les jours pendant dix jours après l'inoculation : Reste indemne. Pas de quinine à partir du onzième jour. Treize jours après l'arrêt, parasites très nombreux (vingt par immersion), l'oiseau en meurt.

La quinine a tenu en échec l'infection tant qu'elle a été administrée. Dès la cessation de la quininisation préventive, l'infection s'est développée et a montré la même virulence que chez les témoins.

2° *Injection tous les jours pendant 10-20 jours après l'inoculation, puis injection tous les 2 jours.*

N° 1020.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	tous les j. (20 j.) — 2 j. (10 j.)	Très rares parasites pendant 3 j.
2e —	2e inoc.	quininisé	— 2 j.	Très rares parasites pendant 2 j.
3e —	3e inoc.	quininisé	— 2 j.	Rares parasites pendant 5 jours.
4e —	4e inoc.	quininisé	— 2 j.	Reste indemne.
5e —		quininisé	— 2 j.	Très rares parasites 1 seul jour.

N° 1021.

1er mois après la 1re inoc.	Quininisé tous les jours pendant 18 j.	Reste indemne.
	Arrêt de la quininisation le 19e jour.	Du 21e au 24e j., très nombreux parasites, tous très jeunes, pendant 3 jours.
	A partir du 21e jour, quininisé tous les 2 jours.	Rares parasites pendant 3 jours.
2e mois après la 1re inoc.	Quininisé tous les jours pendant 8 j.	Très rares parasites pendant 1 seul jour.
	Arrêt de la quininisation le 9e jour.	6 jours après l'arrêt de la quinine, les paras. reparaissent, sont extrêmement nombr. le 10e jour après l'arrêt, puis disparaissent. Pendant ce 2e mois, paras. pend. 11 jours.
3e mois après la 1re inoc.	Pas de quinine.	Très rares parasites pend. 5 jours
4e mois	— —	Rares parasites 1 seul jour. *Mort* à la fin de la 2e semaine. *Grosse rate.*

N° **1030**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	tous les j. (20 j.) / — 2 j. (10 j.)	Très rares parasites 1 seul jour.
2e mois	—	quininisé	— 2 j.	Très rares parasites 1 seul j.
3e mois	— 2e inoc.	quininisé	— 2 j.	Reste indemne.
4e mois	— 3e inoc.	quininisé	— 2 j.	Très rares parasites 1 seul jour. Mort par accident. Rate petite, isodiagnost. négatif.

N° **1031**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé tous les j. (20 j.) / — 2 j. (10 j.)	Reste indemne.
2e mois	— 2e inoc.	quininisé — 2 j. (10 j.) / Pas de quinine les 20 derniers jours.	Très rares paras. pend. 2 jours.
3e mois	—	Pas de quinine.	Très rares paras. pend. 2 jours.
4e mois	—	Pas de quinine.	Très rares paras. pend. 3 jours.

N° **1033**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	tous les j. (20 j.) / — 2 j. (10 j.)	Reste indemne.
2e mois	— 2e inoc.	quininisé	— 2 j. (10 j.)	Reste indemne.
3e mois		quininisé	— 2 j. (10 j.)	Reste indemne.
4e mois	— 3e inoc.	quininisé	— 2 j. (10 j.)	Reste indemne.

N° **1124**.

1er mois après la 1re inoc.	quininisé	tous les j. pend. 22 j. / — 2 j. pend. 6 j.	Reste indemne.

N° **1125**.

1er mois après la 1re inoc.	quininisé	tous les j. pend. 22 j. / — 2 j. pend. 6 j.	Reste indemne.

N° **1127**.

1er mois après la 1re inoc.	quininisé	tous les j. pend. 22 j. / — 2 j. pend. 6 j.	Reste indemne.

N° **1019**.

1er mois après la 1re inoc.	quininisé	tous les j. pend. 13 j.	Reste indemne.

En conclusion, dans ces 10 *cas, la quininisation préventive, répétée quotidiennement avec* 0 *milligr.* 7 *pendant un temps égal à celui de la phase aiguë chez les témoins (de* 10 *à* 30 *jours), a empêché l'envahissement du sang périphérique par les parasites pendant cette période. L'infection sanguine visible au microscope reste très faible ou nulle (fig.* 5*).*

Les mêmes doses de quinine, injectées ensuite tous les 2 *jours, ont continué à tenir en échec le virus, même lorsque l'oiseau subissait plusieurs réinoculations :*

1020. . .	4 inoculations en	5 mois.		
1030. . .	3	—	4	—
1031*. . .	2	—	4	—
1033. . .	3	—	4	—

Lorsque l'on a suspendu la quininisation, soit après la première période de traitement quotidien, soit au cours du traitement d'un jour sur deux, l'infection s'est développée, chez 2 *oiseaux sur* 4, *avec la même virulence que chez les témoins* (voir 1022, 1021, 1031, 1033.)

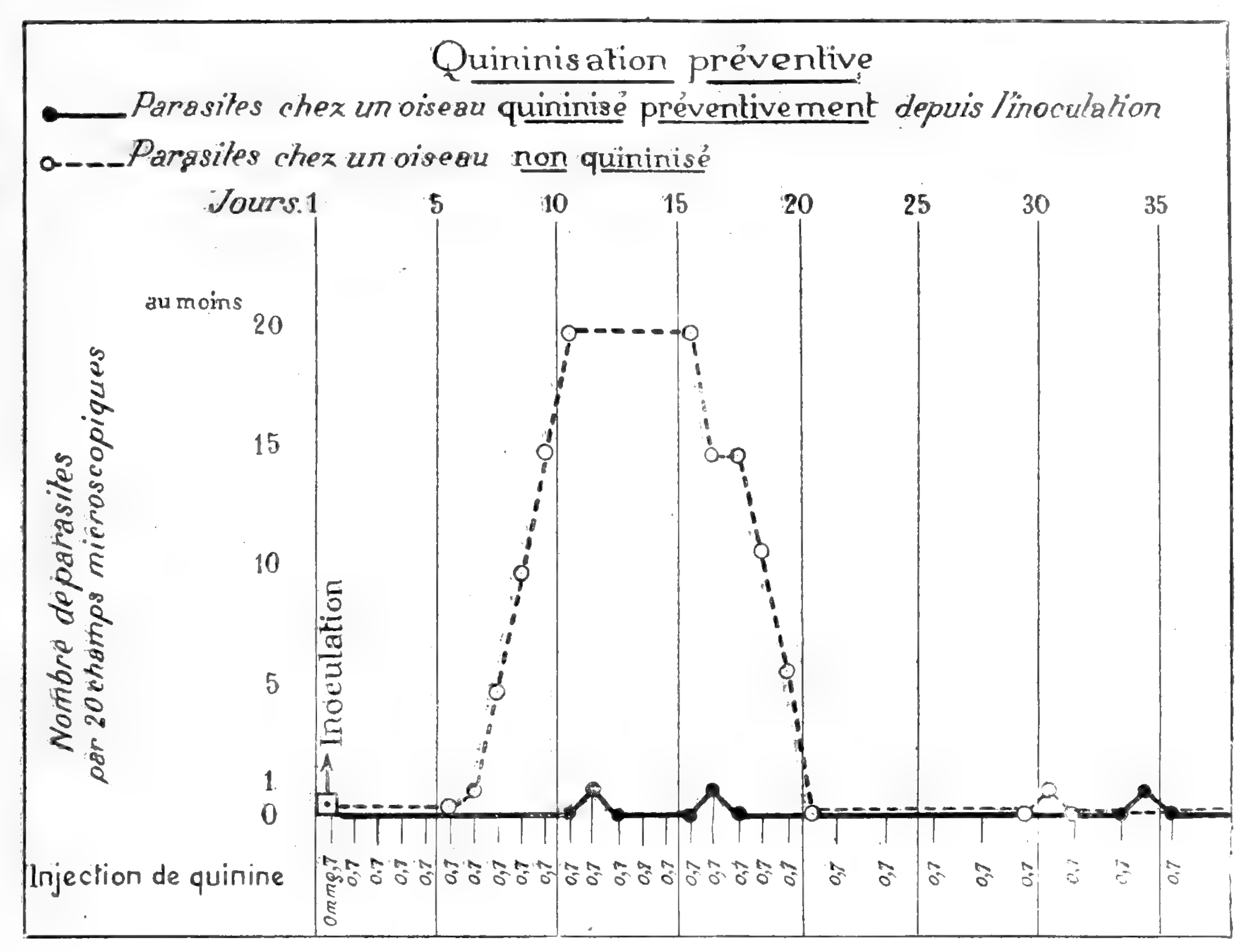


FIGURE 5.

B. — **Quininisation tous les 2 jours.**

Quininisation tous les 2 jours à 0 milligr. 7, à partir du jour de la première inoculation.

N° **1105**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	Rares parasites 1 seul jour.
2e mois —	2e inoc.	quininisé	Reste indemne.
3e mois —		pas de quinine.	Rares parasites 1 seul jour.

N° **1106**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	Reste indemne.
2e mois —	2e inoc.	quininisé	Reste indemne. Meurt par accident. Isodiagnostic négatif.

N° **1104**.

1er mois après la 1re inoc.		quininisé	Rares parasites pend. 4 j.
2e mois	—	2e inoc. quininisé	Rares parasites 1 seul jour.
3e mois	—	quininisé	Parasites en grand nombre. *Mort*.

En conclusion, la quininisation préventive par des injections de 0 milligr. 7 répétées tous les deux jours à partir du jour de l'inoculation a été impuissante, dans 1 cas sur 3, à tenir complètement en échec les *Plasmodium*. Ceux-ci ont pullulé, chez un sujet quininisé depuis deux mois, comme chez les témoins.

Le gain a été ce retard énorme de deux mois dans l'apparition de la phase aiguë.

3° Quininisation par de fortes doses tous les septième et huitième jours.

La dose indiquée par certains auteurs pour l'homme est de 1 gramme donné tous les 7e et 8e jours. Elle correspond à un peu plus du double de la dose préventive quotidienne française (0 gr. 40). Pour expérimenter cette méthode avec le *Plasmodium relictum*, on a employé une dose correspondante pour le canari, c'est-à-dire égale à un peu plus du double de la dose préventive quotidienne reconnue bonne pour cet oiseau, soit le double de 0 milligr. 7 = 1 milligr. 5.

N° **1023**.	Quininisé 3 semaines de suite, 6 injections de 1 milligr. 5 : 1er et 2e jours, 7e et 8e jours, 13e et 14e jours.	Apparition de *Plasmodium* dans le sang retardée de 3 jours, mais les parasites sont ensuite très nombreux, comme chez les témoins.

Conclusion. — La méthode de quininisation préventive par de fortes doses tous les septième et huitième jours s'est montrée inefficace.

CONCLUSION

Les expériences ont porté sur l'infection à *Plasmodium relictum* donnée au laboratoire à des canaris.

1° Si un sujet sain, *absorbant préventivement de la quinine*, reçoit une inoculation sévère de virus fixe, *il ne devient pas malade* (1).

A. — Survie assurée.
Pas d'invasion parasitaire dans le sang périphérique. S'il y a infection, cette infection reste latente d'emblée.

B. — Au contraire les *témoins* non quininisés sont toujours malades.
Mort dans la proportion de 30 p. 100 au cours de la phase aiguë.
Invasion parasitaire intense du sang périphérique du neuvième au quatorzième jour environ après l'inoculation.

2° L'immunité du sujet quininisé, qui résiste à toutes les réinoculations de virus, persiste tant qu'il prend de la quinine. Dès qu'on cesse le traitement, l'infection peut prendre le dessus.

3° Avantages de la quininisation préventive :

A. — *Pour l'individu* :
Empêchement certain des accidents graves de la phase aiguë.
Si l'infection n'est pas totalement jugulée, elle est rendue latente d'emblée, conférant au sujet une immunité relative contre les réinoculations. C'est l'acclimatement sans risques.
Tant qu'elle dure, la quininisation fait donc gagner du temps à la défense de l'organisme, qui pourra, par ses propres moyens, assurer la guérison définitive.

B. — *Pour la collectivité* (si l'on transpose les faits en pathologie humaine) :
Maintien des effectifs (troupes, main-d'œuvre). Les sujets quininisés, n'ayant jamais que des infections latentes, ne sont pas d'aussi dangereux « réservoirs de virus » que les témoins non quininisés, à infection sanguine intense.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

(1) Doses de chlorhydrate tolérées et suffisantes pour un canari de 20 gr. : 0 milligr. 7 en injections sous-cutanées répétées tous les jours pendant trois semaines, à partir du jour de l'inoculation, puis tous les deux jours.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFECTION TUBERCULEUSE CHEZ LES PETITS RONGEURS

par A. BOQUET et L. NÈGRE.

Jusqu'à ces dernières années, le rat et la souris étaient considérés comme réfractaires, ou au moins très résistants, à l'infection tuberculeuse naturelle. Cette opinion fut d'abord combattue par A. Koch et Rabinowitsch qui observèrent jusqu'à 10 p. 100 d'animaux infectés parmi les rats capturés dans certains poulaillers contaminés. De Jong, Weber et Bofinger décrivirent en même temps la tuberculose naturelle de la souris qui est provoquée, comme celle du rat, par des bacilles du type aviaire.

Ces mêmes auteurs puis Strauss, Römer et surtout A. S. et F. Griffith, étudièrent ensuite la tuberculose expérimentale du rat et de la souris domestiques. C'est à Strauss que nous devons cette importante acquisition : que les souris inoculées peuvent mourir après plusieurs semaines ou plusieurs mois sans tubercules apparents dans les viscères, mais avec des organes remplis de bacilles de Koch.

Les expériences (plus de deux cents animaux inoculés) dont nous présentons ci-après le résumé confirment celles des précédents auteurs. Elles nous permettent de préciser quelques faits qui avaient échappé à leur examen, mais n'ajoutent rien d'essentiel à leur conclusion générale : la tuberculose des rats et des souris n'offre qu'un intérêt purement expérimental; ces animaux sont trop peu sensibles à l'action du bacille de Koch, même inoculé à doses massives, pour pouvoir remplacer le cobaye ou le lapin dans les recherches pratiques du laboratoire.

Les voies de l'infection expérimentale.

Quelles que soient les doses des bacilles inoculés, leur virulence et la voie de l'inoculation, les résultats obtenus sont toujours très inconstants. Dans les mêmes conditions expérimentales, un certain nombre de sujets, 20 p. 100 au minimum, échappent apparemment à l'infection. Nous disons en apparence, car l'examen microscopique, si minutieux qu'il soit, ne permet pas d'affirmer l'absence des microbes dans les tissus des rats ou des souris inoculés et indemnes de toute lésion. Seule l'inoculation au cobaye des produits suspects donnerait une certitude absolue.

Il ne semble pas, sauf de rares exceptions, que la tuberculose, même lorsqu'elle est généralisée et que tous les organes sont lésés ou contiennent des microbes en abondance, altère gravement la santé du rat blanc et de la souris blanche. Jusqu'au dernier moment, ces animaux restent vifs, éveillés et conservent un appétit normal. Quelques-uns, cependant, se cachectisent; mais il est difficile de déterminer dans ce fait la part respective de la tuberculose et des infections surajoutées qui troublent fréquemment les expériences de longue durée.

Nos observations ont été poursuivies pendant dix mois. Passé ce délai, tous les animaux qui avaient résisté à l'inoculation ont été sacrifiés.

A. Voie cutanée.

Rats. — Les inoculations intracutanées ont été effectuées dans le coussinet plantaire et dans la queue. L'opération se pratique très aisément, mais la quantité de liquide à injecter ne doit pas dépasser 1/5 à 1/4 de cent. cube; de plus, les injections doivent être poussées lentement, afin d'éviter le rejet de l'émulsion virulente.

Douze à vingt-quatre heures après l'inoculation, la région se tuméfie et devient douloureuse. L'œdème persiste pendant trois ou quatre jours, puis tout rentre apparemment dans l'ordre. Dans les semaines (trois à quatre) qui suivent, un petit abcès caséeux clos se forme au point d'inoculation; en même temps,

les ganglions du flanc se tuméfient et l'examen microscopique y décèle des bacilles.

Dans un cas, dont l'évolution a été particulièrement rapide, l'animal est mort cachectique au bout de neuf semaines. Ses poumons étaient en grande partie transformés en une masse dure, mamelonnée, blanc grisâtre, d'aspect sarcomateux. Cette masse fibreuse était composée d'une série de noyaux dont les plus petits avaient les dimensions d'une tête d'épingle, les plus gros d'une lentille. Le poumon droit, plus gravement lésé, formait une volumineuse tumeur qui refoulait le diaphragme. Sur la plèvre pariétale existaient plusieurs nodules identiques et, dans la zone corticale du rein droit, un noyau du volume d'un pois. Toutes ces lésions présentaient une paroi épaisse, résistante, et un contenu caséeux qui fourmillait de bacilles.

Dans un autre cas, l'épiploon était criblé de petits tubercules, ainsi que le foie, la face postérieure du diaphragme, les bords de la rate et la surface de l'intestin où ils apparaissaient comme enchâssés. Très nombreux tubercules miliaires sur les deux poumons et sur la plèvre. Les ganglions trachéo-bronchiques très volumineux étaient caséifiés.

La tuberculose du rat ainsi réalisée par la voie cutanée ne présente pas toujours cette intensité ; parfois même, les inoculations restent négatives. Lorsque les lésions macroscopiques sont limitées aux poumons et que les autres organes restent indemnes, on observe fréquemment des bacilles dans les frottis de foie. Nous n'en avons rencontré ni dans la rate, ni dans les reins.

La dose infectante minimum a été de 0 milligr. 0002 (bacilles humains ou bovins) ; mais les doses inférieures à 1 milligr. donnent des résultats très inconstants. Le bacille aviaire à la dose de 2 milligr. a fourni un cas positif (tuberculose pulmonaire).

Souris. — La souris paraît moins sensible que le rat à l'inoculation intracutanée. Tantôt on n'observe dans les organes que de rares amas bacillaires sans lésions macroscopiques, tantôt, au contraire, les poumons sont envahis par de nombreux petits tubercules.

La dose infectante minimum a été de 0 milligr. 005.

B. Voie sous-cutanée.

1° *Rats.* — D'après Cobbett l'inoculation sous-cutanée de doses, même très fortes, de bacilles ne provoque qu'un petit foyer purulent local; les ganglions lymphatiques voisins ne sont pas atteints. Contrairement à cet auteur, nous avons obtenu par la même voie, aussi bien avec des bacilles humains qu'avec des bacilles bovins, l'évolution d'une tuberculose pulmonaire d'intensité variable traduite par l'apparition de petits nodules grisâtres, arrondis, dont les dimensions atteignaient celles d'une tête d'épingle. Aucune lésion locale ne s'est produite au point d'inoculation; tous les organes, sauf les poumons, paraissaient sains et ne contenaient pas de bacilles de Koch.

La dose infectante minimum est de 0 milligr. 01. L'infection est plus sûrement réalisée lorsque les inoculations virulentes sont répétées à de courts intervalles (4 à 5 injections effectuées tous les 5 jours).

2° *Souris.* — A. S. et F. Griffith, Weber et Bofinger ont réussi à tuberculiser la souris par inoculation sous-cutanée de hautes doses de bacilles, principalement de bacilles aviaires. Des lésions locales apparaissent au point d'inoculation; petits nodules caséeux évoluant vers l'abcédation et s'ouvrant à travers la peau par un ulcère persistant.

Au cours de nos essais les souris se sont montrées encore plus résistantes que les rats au même mode d'inoculation (bacilles humains et bovins), sauf un cas sur 12 où existaient à la surface du foie de petites taches blanchâtres, arrondies, non saillantes, contenant des bacilles, la tuberculisation des différents organes n'a pu être observée. Néanmoins la rate et les ganglions lymphatiques de la région inoculée renfermaient un assez grand nombre de bacilles granuleux et apparemment dégénérés.

C. Voie péritonéale.

1° *Rats.* — La voie péritonéale est la voie d'inoculation la plus sûre. Dans la plupart des cas les lésions spécifiques initiales consistent en de petits nodules des dimensions d'une tête

d'épingle ou davantage qui se développent soit sur l'épiploon, soit sur le mésentère, soit sur le péritoine pariétal dans la région sous-lombaire; certains même sont libres et flottent dans la cavité abdominale. Ces formations sont constituées par un feutrage de bacilles libres au milieu desquels les leucocytes apparaissent très rares. Elles représentent de véritables colonies microbiennes qui s'accroissent lentement sans provoquer de réaction leucocytaire appréciable ni de lésions inflammatoires des séreuses qui les supportent.

Les organes de la cavité abdominale ne sont pas ou sont exceptionnellement lésés. Le foie, la rate et les ganglions mésentériques en particulier n'en renferment pas moins de très nombreux bacilles.

Les lésions s'étendent ensuite aux poumons où, dans un délai minimum de quarante-cinq jours après l'inoculation, apparaissent de petits tubercules fins, arrondis, tranchant par leur couleur grisâtre sur le fond rosé du tissu pulmonaire.

Les doses infectantes minima ont été de 1 milligramme pour l'inoculation unique (bacilles bovins ou humains) et de 0 milligr. 01 pour les inoculations répétées (5 injections effectuées à cinq jours d'intervalle).

2° *Souris.* — Nos observations confirment celles de Griffith, Weber et Bofinger et de la Royal Commission. La souris est plus sensible encore que le rat à ce mode d'infection.

Les lésions péritonéales provoquées par l'inoculation de bacilles humains ou bovins consistent en de petits nodules durs formés d'un amas de microbes altérés, granuleux et d'éléments cellulaires en petit nombre, au moins dans la partie caséeuse centrale. Parfois ces nodules se développent à la surface de la rate ou du foie ; serrés les uns contre les autres ils forment une petite masse blanchâtre, mamelonnée, facilement énucléable. Le foie, même non lésé, contient des bacilles mais en moins grande quantité que les organes des rats infectés par la même voie. La rate, au contraire, apparemment saine ou légèrement hypertrophiée est souvent d'une richesse extraordinaire en bacilles libres et certains frottis ont, à l'examen microscopique, l'aspect d'une colonie étalée.

L'extension aux poumons se produit dans les mêmes condi-

tions que chez le rat. En outre les ganglions mésentériques et trachéo-bronchiques peuvent subir la dégénérescence caséeuse.

La dose infectante minimum a été de 1 milligramme pour l'inoculation unique et de 0 milligr. 01 pour les inoculations répétées (5 inoculations à cinq jours d'intervalle).

D. Voie digestive.

Rats et souris, même très jeunes, paraissent présenter une égale résistance à l'infection tuberculeuse par les voies digestives. Sur 26 rats nourris par A. S. Griffith avec des aliments mélangés à des bacilles bovins ou avec du lait et des organes tuberculeux, les microbes ont franchi dans 17 cas la barrière intestinale et se sont fixés dans les ganglions mésentériques. Aucune lésion intestinale n'a pu être relevée, et sur 2 animaux seulement il existait des lésions des ganglions mésentériques sous la forme de petits points grisâtres, à peine visibles à l'œil nu. Tous les autres étaient indemnes et leurs organes ne renfermaient pas de bacilles de Koch. 4 rats ayant ingéré des organes de lapins infectés par des bacilles aviaires n'ont présenté aucune lésion. Sur un seul l'examen microscopique révéla la présence de quelques bacilles dans le foie et les reins (F. Griffith).

Nous avons provoqué la tuberculisation du jeune rat (six semaines environ) par l'administration de repas infectants répétés à de courts intervalles (1 milligramme de bacilles bovins émulsionnés dans du jaune d'œuf ingérés tous les jours pendant cinq jours). Après plusieurs semaines, des tubercules pulmonaires très riches en bacilles libres se développèrent, mais aucune lésion macroscopique n'apparut dans les autres organes, et les ganglions mésentériques, ainsi que le foie, ne contenaient pas de microbes.

De nombreuses expériences positives d'infection de la souris par les voies digestives ont été effectuées par Weber et Bofinger et par Griffith au moyen de bacilles aviaires, humains ou bovins. Deux fois sur 4 essais nous avons également réussi à tuberculiser des souris en leur faisant ingérer à 5 reprises tous les cinq jours, ou à 2 reprises à quarante jours d'intervalle, de très hautes doses (10 milligrammes) de bacilles bovins. Dans la pre-

mière expérience il n'existait aucune lésion macroscopique des organes, mais les frottis de foie montraient en très grande abondance des bacilles dont certains avaient partiellement perdu leur acido-résistance. La rate en contenait un petit nombre ; les poumons, les reins, les ganglions médiastinaux, pourtant hypertrophiés, en étaient indemnes. Durée de la maladie : 100 jours.

Dans la deuxième expérience, même absence de formations tuberculeuses ; quelques rares bacilles purent être décelés dans le poumon ; aucun dans la rate et le foie. Durée de la maladie : 195 jours.

Virulence comparée des différentes races de bacilles.

Le rat et la souris inoculés par la voie digestive, sous-cutanée ou péritonéale, sont, d'après les observations de Griffith et les nôtres, également sensibles aux bacilles humains, bovins ou aviaires. Binder et Aoki ont constaté que les souris blanches inoculées par la voie veineuse (1 milligramme de bacilles dans les veines latérales de la queue) sont plus rapidement tuées par les bacilles humains que par les bacilles bovins. Les bacilles humains administrés par la même voie seraient au contraire plus virulents pour le rat que pour la souris.

Sauf une réaction locale assez forte sous la forme d'une tuméfaction douloureuse persistant deux ou trois jours, nous n'avons obtenu aucun résultat par inoculation intracutanée de bacilles homogènes d'Arloing et de bacilles pisciaires.

Caractères des bacilles observés dans les lésions.

Les bacilles bovins rencontrés dans les lésions sont courts, trapus et d'autant plus granuleux que l'infection est plus ancienne. Les bacilles humains, au contraire, sont longs et fins et plus régulièrement colorés. Ils se présentent isolés ou en amas, parfois en chaînettes de 2 à 4 éléments rectilignes ou légèrement incurvés, libres ou intracellulaires. Ces caractères sont presque toujours suffisamment nets pour permettre de diagnostiquer avec sûreté la race des bacilles inoculés.

Sensibilité à la tuberculine.

Des rats tuberculeux, éprouvés sous la peau avec 0 gr. 05 et 0 gr. 10 d'une tuberculine extraite de cultures sur milieux glucosés, n'ont présenté aucun trouble. 1 centigramme de cette tuberculine relativement peu toxique correspondait à 0 gr. 06 de tuberculine brute. La dose mortelle pour un cobaye tuberculeux de 350 grammes était de 0 gr. 18.

Phénomène de Koch.

Nous n'avons pas observé le phénomène de Koch sur les rats et les souris éprouvés par la voie sous-cutanée avec des doses variant de 0 milligr. 01 à 1 milligramme de bacilles dix-huit à vingt-deux jours après l'inoculation initiale. Il ne s'est pas davantage produit d'abcès sur les mêmes animaux inoculés tous les cinq jours, à 5 reprises, avec des doses de bacilles vivants variant de 0 milligr. 01 à 1 milligramme.

CONCLUSIONS

Les rats blancs et les souris blanches sont trop peu sensibles à la tuberculose expérimentale pour servir utilement à la recherche du bacille de Koch dans les produits suspects.

L'inoculation intrapéritonéale de 1 à 2 milligrammes de bacilles d'un des trois types : humain, bovin ou aviaire provoque la formation de lésions pulmonaires accompagnées d'une intense multiplication des microbes dans certains organes, même non lésés, le foie en particulier et la rate.

Si l'inoculation intrapéritonéale est la voie la plus sûre, surtout chez la souris, c'est l'inoculation intracutanée (coussinet plantaire) qui détermine les lésions les plus étendues et les plus graves.

La répétition des inoculations à de courts intervalles favorise l'infection.

Les rats et les souris ne succombent qu'exceptionnellement à la tuberculose. Les lésions n'apparaissent que tardivement.

Pratiquée moins de deux mois après l'inoculation, l'autopsie ne fournit que des renseignements négatifs. L'examen macroscopique doit toujours être complété par l'examen microscopique des frottis d'organes, principalement du foie, de la rate et des poumons.

(Laboratoire du professeur Calmette à l'Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

AOKI. *Zeitsch. für Hygiene*, vol. LXXV, 1913.

W. BINDER. *Bericht über das Veterinärninstitut*. Leipzig, 1913.

A. CALMETTE. L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Paris, Masson, 1920.

L. COBBET. *The causes of tuberculosis*. Cambridge, 1917.

A. S. GRIFFITH. *R. C. T.* Fin. Rep., 1911 et *R. C. T.* Int. Rep., **2** et **4**.

A. S. et F. GRIFFITH. *R. C. T.* Fin. Rep., vol. III.

DE JONG. *XI*[e] *Congrès intern. d'hyg. et dermat.* Bruxelles.

A. KOCH et L. RABINOWITSCH. *Virchow's Archiv*, 1907, **190**.

RÖMER. *Beitr. exp. Therapie*, fasc. 6, 1903.

STRAUSS. *La tuberculose et son bacille*.

WEBER et BOFINGER. *Tub. Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, fasc. 1.

ENQUÊTE SUR LE BOUTON D'ORIENT EN CRÈTE. RÉFLEXIONS QU'ELLE SUGGÈRE SUR L'ÉTIOLOGIE ET LE MODE DE DISPERSION DE CETTE MALADIE

par GEORGES BLANC et JEAN CAMINOPETROS.

Si l'on consulte la littérature classique consacrée au bouton d'Orient on se rend compte, comme le dit Charles Nicolle (1), « que l'immense majorité des cas de cette maladie est liée à une même bande de terre et aux conditions toujours les mêmes qui l'y attachent ». Les cas observés en dehors de cette zone, cas ectopiques, sont rares. Et cependant les quelques observations publiées sur les cas de bouton d'Orient observés en Crète laissent entrevoir qu'il ne s'agit plus de cas ectopiques, mais qu'il semble y avoir un réel foyer en dehors de la bande de terre signalée plus haut.

Cardamatis, il est vrai, décrit en 1909 4 cas observés par lui et Melissidis à Héracleion (Candie) et conclut qu' « actuellement *cette maladie n'est pas fréquente* »; mais, dans ses travaux postérieurs, il mentionne certains faits à l'appui de la non-rareté du bouton d'Orient. En 1911, notamment, à l'occasion de deux cas nouveaux décrits par lui et Melissidis (2), ce même auteur dit à propos de Pera, village des environs d'Héracleion : « Dans ce village, d'après les renseignements fournis par lui-même (le malade) et pendant son séjour, il y avait *plusieurs personnes atteintes de bouton d'Orient.* » Plus loin il dit, à propos d'un autre cas, « Peristeris..... s'étant rendu..... au village de Zarkou, province de Malevysion en Crète, et où *les cas de bouton d'Orient sont fréquents* »... Ajoutons que Photinos, à propos du traitement du bouton d'Orient par le chlorhydrate

(1) CH. NICOLLE. La question du réservoir de virus du bouton d'Orient. *Bull. Soc. path. exot.*, 1920, **13**, p. 513.
(2) J. P. CARDAMATIS et A. MELISSIDIS. *Bull. Path. exot.*, 1911, **4**, p. 457.

d'émétine (1), signale 23 cas provenant de Crète soignés et guéris soit par lui, soit par d'autres médecins depuis l'année 1918 jusqu'en mars 1920.

Comme nous l'avons dit, ces quelques observations donnaient à penser que le bouton d'Orient de Crète ne devait pas procéder par cas isolés, mais qu'il régnait endémiquement dans la grande île de Grèce. Les renseignements que nous avons recueillis à Athènes, notamment près du Dr Photinos, nous ont confirmés dans cette idée. Un court voyage de prospection entrepris par nous du 11 août au 2 septembre nous permet d'apporter notre contribution personnelle et d'affirmer que la Crète représente actuellement un des principaux foyers de la Leishmaniose cutanée du bassin méditerranéen. Cette constatation et le fait que le bouton de Crète est très probablement d'importation africaine récente rendent particulièrement intéressantes les données épidémiologiques que l'on peut glaner sur place et nous incitent à publier nos observations.

D'après Cardamatis, le bouton d'Orient aurait été introduit en Crète en 1836 par des soldats ottomans originaires de Crète et contaminés en Syrie pendant leur campagne contre les Druses. La tradition orale, telle que nous l'avons recueillie sur place à la Canée, à Héracleion (Candie), à Saint-Myron, auprès de médecins, de commerçants ou de paysans, si elle diffère par le détail, reste conforme à l'idée d'une introduction récente. Les uns, le plus grand nombre, prétendent que le bouton d'Orient a été introduit en 1822 par l'armée de Mehmet-Ali. On sait en effet que ce dernier avait envoyé d'Egypte, sous le commandement de Assan-pacha, une armée de 6.000 hommes pour réprimer la révolution crétoise. Cette armée débarqua dans la baie de la Sude, près de la Canée, et fit sa jonction avec la garnison turque de la Canée. L'année suivante une nouvelle armée forte de 8.000 hommes, venue également d'Egypte sous le commandement d'Husseïn-bey, débarquait en Crète. D'autres, peu nombreux, reportent à 1866 l'introduction du bouton d'Orient. Cette fois par l'armée égyptienne de Sahin-pacha qui, forte de 5.000 hommes, débarqua à la baie de la

(1) G. Photinos. Un nouveau traitement du bouton d'Orient (de Crète) par des injections locales de chlorhydrate d'émétine. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1920, **13**, p. 290-297.

Sude. Quoi qu'il en soit, il est intéressant de rapprocher ces traditions du fait que, dans toute la Crète, le bouton d'Orient porte le nom de Καννιώτικα, bouton de la Canée (en Grec Κανιά).

Ajoutons qu'à la Canée, en langue populaire, le bouton d'Orient est appelé « Libinos ». Faut-il voir dans ce mot un rappel du mot grec Λυβύν (Libye) ou plus simplement la déformation du mot Λούπινον, en langage populaire Λουμπούνια *Loubonnia* (1) qui sert à désigner le *Lupinus augustifolius* et dont le fruit rappellerait, très vaguement d'ailleurs, la forme du bouton d'Orient à son début.

Enquête à la Canée.

La Canée, ville de 24.000 habitants, s'étale sur une plage basse, surtout étendue à l'ouest. C'est là que se trouve le quartier neuf de Kénouria-Kora. A l'est, la plage se relève vite au pied des pentes qui dominent le faubourg de Khalepa. Au sud et au sud-ouest s'étend une plaine alluvionnaire sur une distance de quatre kilomètres environ jusqu'aux derniers contreforts du massif de Keramia de 4 à 500 mètres d'altitude. Ces collines sont les avant-gardes des grands massifs des monts blancs (Aspra-Vouna) aux nombreuses cimes rapprochées les unes des autres et dont plusieurs dépassent 2.000 mètres d'altitude. Un seul ruisseau, à proximité de la Canée, traverse la plaine, le Cladiso, torrent presque à sec l'été, dont l'embouchure est à un kilomètre de la ville. La ville ancienne de la Canée est enfermée dans ses vieilles murailles vénitiennes. Les rues, particulièrement dans les quartiers de Chiona et de Galata, près du port, sont étroites, bordées de hautes maisons dans lesquelles s'entasse une population en partie musulmane. Trop à l'étroit, la ville a peu à peu franchi ses remparts. A l'est, le faubourg de Koum-Kapi, trop-plein du quartier turc de la ville intérieure, se presse contre les remparts et s'étend sur la plage. Plus à l'est se trouve le faubourg aristocratique de Khalepa aux grandes maisons isolées et entourées de beaux jardins. A l'ouest s'est bâti en plein sable le quartier neuf, Kénouria-

(1) On sait qu'en grec moderne le B se prononce V et que le son français B se représente par l'association des lettres M Π.

Kora, dont les maisons pour la plupart modestes abritent une population très dense de grecs orthodoxes.

Pendant notre court séjour nous avons exploré la Canée et ses faubourgs, recherchant les cas de bouton d'Orient et les Insectes piqueurs. Nous nous sommes également efforcés de savoir si les animaux incriminés comme réservoir de virus étaient fréquents ou même existaient dans ce foyer du bouton d'Orient. Nous consignons ci-dessous le résultat de cette enquête.

Abondance et répartition des cas de bouton d'Orient.

Notre enquête a été menée de la façon suivante : le matin nous recevions et traitions au palais du gouverneur tous les cas suspects de bouton d'Orient. Notre consultation était rendue publique par annonces dans tous les journaux de la localité (1). L'après-midi nous faisions, quartier par quartier, une enquête verbale, nous faisant indiquer les cas connus, pénétrant dans les maisons, interrogeant les enfants et multipliant autant que possible les conditions d'investigation. Le résultat de cette prospection fut favorable, puisqu'en quelques jours nous avons pu déceler vingt cas contrôlés par l'examen microscopique. Ces cas sont les suivants :

N° 1. — Constantin Tsi..., trente-sept ans, habite le quartier de Koum-Kapi. Bouton siégeant à la région temporale droite et empiétant sur le cuir chevelu où il revêt une forme ecthymateuse. Le bouton est apparu il y a quatorze mois, soit en juin 1919.

N° 2. — Alexandre Vass..., six ans, habite Koum-Kapi. Bouton érythémato-papuleux siègeant sur l'arête du nez, apparu depuis quinze jours, soit en juillet 1920.

N° 3. — Evanghelia F..., dix-neuf ans, habite Kenouria-Kora. Bouton très saillant de la grosseur d'une cerise à l'extrémité du nez, apparu depuis huit mois, soit en décembre 1919.

N° 4. — Chariklya Mar..., soixante-dix ans, habite le quartier Saint-Argyre, près du quartier Chiona. La malade porte à la main droite et au poignet droit sept boutons, soit : un sur la face dorsale de la phalange du cinquième doigt, un sur la face dorsale de la phalange du quatrième doigt, un au niveau

(1) Nous tenons à remercier M. Polychronidis, secrétaire général du Gouvernement, pour la complaisance avec laquelle il s'est mis à notre disposition.

de l'articulation carpo-métacarpienne du pouce, un au bord radial, un à la face antérieure et un au bord cubital du poignet.

A la main gauche elle porte un bouton sur la face dorsale de la phalange



Fig. 1. — Bouton d'Orient de la face (cas n° 4). La Canée.

du cinquième doigt. Elle en porte un autre à la face externe du mollet gauche.

Enfin la figure (fig. 1) est couverte d'une large nappe d'un rose violacé, par endroit squameuse, recouvrant le nez, les joues, la lèvre supérieure.

rejoignant l'angle interne de l'œil gauche dont les paupières et particulièrement la paupière supérieure sont œdématiées. A l'angle interne de cet œil gauche existe une petite ulcération. L'aspect de ce large bouton est celui d'un lupus érythémateux ou d'un érysipèle. Ce dernier diagnostic a d'ailleurs été porté peu de temps auparavant. L'état général de la malade est bon, aucune fièvre. L'affection a débuté par l'angle interne de l'œil gauche il y a six mois, soit en février 1920; rapidement le bouton s'est étalé sur le nez et les joues, en même temps qu'apparaissaient les boutons de la main droite et du mollet. Le bouton de la main gauche daterait, au dire de la malade, de trois semaines seulement, il serait apparu sur une plaie produite par piqûre de fil de fer. Les examens de tous les boutons, répétés plusieurs fois pour celui de la figure, ont été positifs et ont montré de très abondantes *Leishmania*.

N° 5. — Joseph Bod..., dix ans, habite Kénouria-Kora. Un bouton sur le pavillon de l'oreille droite, un sur la joue droite, trois au cou. L'affection date de huit mois, soit de décembre 1919. Il est impossible de savoir si les boutons sont apparus successivement ou simultanément.

N° 6. — X..., huit ans, habite Koum-Kapi. Un bouton sur la joue droite. Date d'apparition inconnue.

N° 7. — X. X..., neuf ans, habite Koum-Kapi. Un bouton sur le lobe de l'oreille gauche, un sur la joue droite. Date d'apparition inconnue.

N° 8. — Ali S..., quatre ans, habite le quartier de Chiona. Un bouton à la joue droite, un à la joue gauche. Date d'apparition inconnue.

N° 9. — Ali Calim..., sept ans, habite le quartier de Chiona. Un bouton au front, deux au poignet droit. Date d'apparition inconnue.

N° 10. — Zainé Zanit..., douze ans, habite le quartier de Chiona. Cette jeune fille porte cinq boutons à la jambe gauche qui remonteraient à une année, soit à juillet 1919.

N° 11. — Zekio Salib..., sept ans, habite le quartier de Zarkona près de Chiona. Un bouton sur la face antérieure de l'avant-bras gauche et un sur la face antérieure de l'avant-bras droit. Le début de l'affection remonte à huit mois, soit à janvier 1920.

N° 12. — Zakiré Lar..., huit ans, habite le quartier de Zarkona. Elle porte un bouton sur la face antérieure de l'avant-bras gauche; pas de renseignements sur la date d'apparition.

N° 13. — Nazli Salib..., huit ans, habite le quartier de Zarkona. Il porte deux boutons à la main droite, un au poignet gauche. Pas de renseignements sur la date d'apparition.

N° 14. — Azizé Marc..., huit ans, habite le quartier de Chiona. Elle porte sur l'arête du nez un bouton en voie de guérison, pas de renseignements sur la date d'apparition.

N° 15. — Constantin Sarid..., quarante-cinq ans, habite Kénouria-Kora. Porte au menton un bouton datant de huit mois, soit de janvier 1920.

N° 16. — Antonia Cal..., vingt-cinq ans, habite le quartier de Chiona. Elle

porte trois boutons à l'avant-bras droit, deux au coude gauche, deux au poignet gauche. Sa maladie daterait de plus d'un an.

N° 17. — Admed Sel..., quatre-vingts ans, habite le quartier de Kolata. Il porte deux boutons, un au poignet gauche et un au poignet droit. Au moment où nous l'examinons ces boutons sont couverts de mouches. Ils dateraient d'un an, juillet 1919.

N° 18. — Mertzani Az..., soixante ans, habite le quartier Chiona. Il porte sur le front trois boutons non ulcérés qui seraient apparus il y a un mois, soit en juillet 1920.

N° 19. — Houssein Samb..., quatre-vingt-dix ans, habite le quartier de Chiona. Il porte six boutons : un sur le front, un sur l'arête du nez, un sur la face externe de la jambe gauche, un sur la face antérieure de l'avant-bras droit, un sur le lobe de l'oreille gauche, un sur celui de l'oreille droite. Le début de l'affection remonte à six mois, soit à février 1920. Impossible de savoir si les boutons sont apparus simultanément.

N° 20. — Stillani Cast..., trente-cinq ans, habite la ville ancienne, quartier Splanza. Porte depuis six mois, soit depuis février 1920, un bouton à la face antérieure du poignet gauche.

De l'analyse de ces 20 cas, il n'est pas possible de généraliser les conclusions. Remarquons seulement que, en concordance avec les notions classiques, nous observons une localisation particulièrement fréquente aux mains, poignets et avant-bras (27 boutons), à la tête, face, nez, oreilles (24 boutons); plus rare aux membres inférieurs (7 boutons sur 58 au total), nulle sur le corps. A noter également la plus grande fréquence des cas de Leishmaniose à boutons multiples : sur vingt malades douze sont porteurs de plusieurs boutons, huit d'un seul.

La date d'apparition des boutons, par conséquent l'influence des saisons, paraît difficile à préciser.

En Grèce, on observe des cas de bouton d'Orient en toutes saisons. Tel est l'avis du professeur Photinos qui, à Athènes, à l'hôpital Syngros, voit passer la plupart des cas venus de Crète et les rares cas ectopiques qu'ont fournis Patras et quelques autres lieux.

Telle est également l'opinion des médecins crétois que nous avons consultés tant à la Canée qu'à Héracleion (Candie) ou à Saint-Myron.

La très longue durée du bouton d'Orient et sa fréquence en Crète expliquent facilement qu'il ne soit pas saisonnier. Il est plus difficile de savoir si les saisons ont une influence sur la

date d'apparition. Il faudrait pour cela faire une enquête longue et minutieuse, car les renseignements fournis par les malades sont tout à fait sujets à caution et demandent à être vérifiés.

En interrogeant les vingt porteurs de bouton d'Orient que nous avons observés, nous avons pu douze fois obtenir une réponse sur la date d'apparition de leur affection. Deux fois le bouton serait apparu en janvier (cas 11 et 15), trois fois en février (cas 4, 19, 20), une fois en juin (cas 1), quatre fois en juillet (cas 2, 10, 17, 18) et deux fois en décembre (cas 3 et 5).

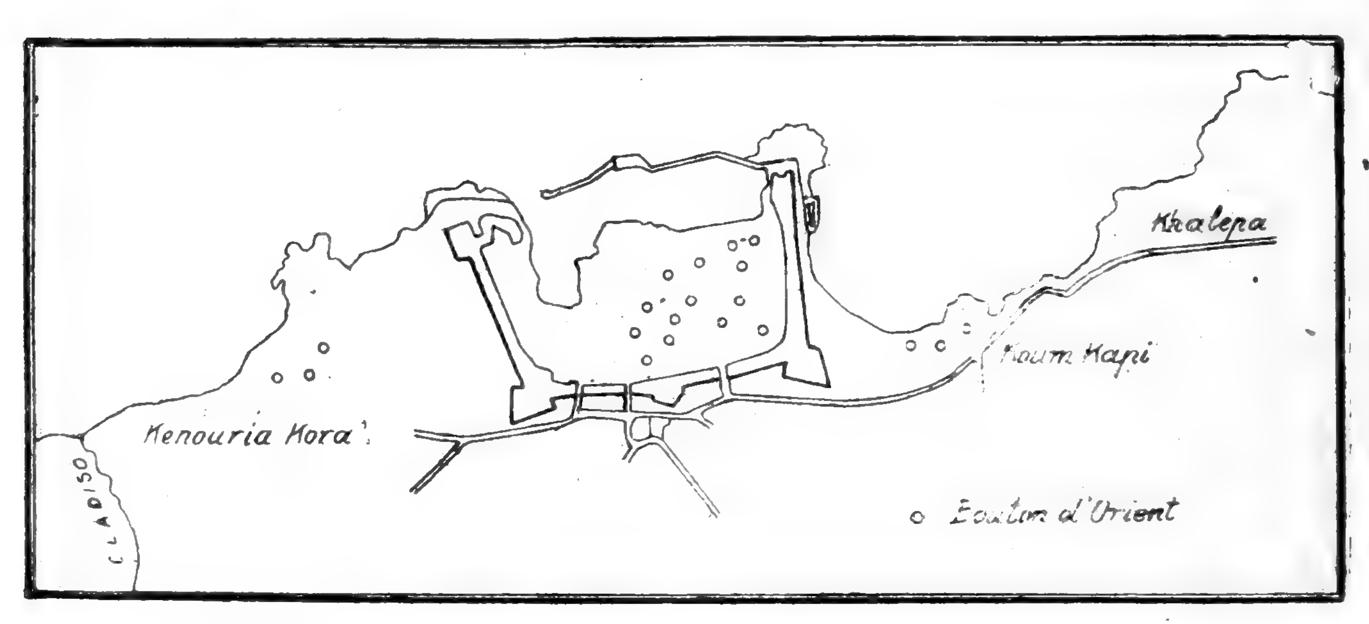


Fig. 2. — Plan de la Canée avec la répartition des cas de bouton d'Orient par quartier.

Ce qui donne onze cas pour la période allant de juillet à février et un cas pour celle de mars à juin. Proportion qui, avec les restrictions à faire sur les renseignements oraux, cadre assez bien avec les données classiques.

En étudiant la répartition géographique de nos 20 cas (fig. 2) nous trouvons que les vieux quartiers sont les plus contaminés : quatorze cas pour la ville fortifiée, trois cas pour le petit quartier de Koum-Kapi, trois cas seulement pour Kénouria Kora, alors qu'on n'observe aucun cas à Khalepa.

Il ne semble pas qu'entre tous ces quartiers existe de différence portant sur la faune des insectes piqueurs ou sur l'existence de réservoirs de virus. Par contre les conditions de vie n'y sont pas les mêmes.

Dans les quartiers de Kénouria Kora et surtout du port et de Koum-Kapi, les habitations sont entassées. Sur la plage les

enfants jouent ensemble et le contact entre contaminés et bien portants est constant. A Kalepa, au contraire, l'isolement des maisons d'habitation et la faible densité de la population rendent ce facteur négligeable.

Recherche des insectes piqueurs.

Cette étude n'a pu être très poussée à cause de notre court séjour. La prospection que nous avons faite dans les maisons et particulièrement dans celles de porteurs de bouton d'Orient a été peu fructueuse. Nos plus nombreuses captures proviennent de nos chambres personnelles. Ces chambres possédaient un placard sombre, que nous avions soin de laisser entr'ouvert la nuit, il constituait un excellent piège où le matin nous trouvions les insectes piqueurs, qui s'étaient gorgés sur nous pendant la nuit. Les espèces recueillies appartiennent aux genres *Culex* et *Phlebotomus*. Une seule fois nous avons capturé un Chironomide.

La recheche des larves a été également très peu fructueuse. Comme nous l'avons dit, un seul ruisseau arrose la Canée, le Cladiso ; dans ce gîte nous n'avons trouvé au cours de trois explorations minutieuses que deux jeunes larves d'Anophélines.

Recherche des animaux « réservoirs de virus ».

Cette recherche n'a porté que sur le Gecko. Inutile lorsqu'il s'agit d'un animal tel que le Dromadaire, qui manifestement n'existe pas à la Canée, elle était impossible à exécuter sur de petits rongeurs. Malgré une observation attentive nous n'avons pas trouvé de Gecko (*Tarentola mauritanica*). Les seules espèces de sauriens que nous avons trouvées sont l'*Hemidactylus turcicus* à Khalepa, le *Gongylus ocellatus* fréquent aux abords de la ville, le *Lacerta viridis* très abondant partout. Cette absence ou cette grande rareté du Gecko à la Canée n'est pas surprenante. Le *Tarentola mauritanica* est rare en Grèce. Il n'a pas été trouvé par la Mission scientifique de Morée (1),

(1) Expédition scientifique de Morée. *Section des sciences physiques*, 3 Paris, 1832.

Heldreich (1), Bedriaga (2) ne le signalent pas dans la Grèce continentale. Erhard (3) l'a trouvé peu fréquemment dans les Cyclades. En Crète les naturalistes ne le mentionnent pas : Raulin (4), qui parcourut pendant sept mois la Crète et séjourna à la Canée, ne le donne pas dans sa liste de reptiles. Heldreich, qui lui aussi explora pendant sept mois la Crète, du mois de février au mois de septembre, ne l'a jamais vu. Cependant Bedriaga (5) signale qu'au musée zoologique d'Athènes existe un exemplaire de *Tarentola mauritanica* avec la mention : Saint-Myron, Crète. Nous avons retrouvé cet exemplaire qui est effectivement un Gecko et dont la provenance ne paraît pas douteuse. Nous avons nous-mêmes capturé un Gecko et vu deux autres exemplaires dans les ruines du palais de Cnossos à quelques kilomètres d'Héracleion (6). Cette absence de Gecko dans un foyer important de bouton d'Orient confirme les conclusions tirées par Nicolle, Langeron, et l'un de nous (7), de leurs recherches à Tamerza, dans le Sud tunisien, conclusions allant à l'encontre de l'hypothèse du Gecko réservoir de virus.

Enquête dans la région d'Héracleion (Candie).

Notre enquête a porté cette fois non plus sur un grand foyer citadin, mais sur un foyer restreint permettant une analyse plus serrée des conditions étiologiques. Nous avons choisi pour cette étude la région d'Héracleion. Nous nous sommes installés à 15 kilomètres au sud de la ville dans le monastère de Gorgolaïni (8). Le monastère situé à 400 mètres d'altitude domine les pentes mamelonnées qui descendent à la mer, il se dresse sur une colline formée de roches calcaires noirâtres d'étages

(1) Heldreich. De Th. *La Faune de Grèce*, Athènes, 1878.

(2) V. J. Bedriaga. *Die Amphibien und Reptilien Griechenlands,* Moscou, 1882.

(3) Erhard. *Fauna der Cycladen*, Leipzig, 1858.

(4) V. Raulin. *Description physique de l'île de Crète*, Paris, 1869.

(5) J. Bedriaga. *Die Amphibien und Reptilien Griechenlands*, Moscou, 1882.

(6) Notre ami Renaundin, de l'Ecole française d'Athènes, qui avait assisté à notre capture à Cnossos, nous a déclaré avoir vu un Gecko à Hierapetra, c'est le seul qu'il a observé dans un voyage de deux mois à travers la Crète.

(7) Ch. Nicolle, G. Blanc, M. Langeron. Recherches expérimentales sur le rôle du Gecko (*Tarentola mauritanica*) dans l'étiologie du bouton d'Orient. *Bull. Soc. Path. exot.*, 7 juillet 1920, p. 508-511.

(8) Nous tenons à remercier ici l'archevêque de Crète, Monseigneur Titos, qui a bien voulu nous donner une lettre d'introduction pour le monastère et le directeur du monastère de Gorgolaïni pour son aimable hospitalité.

crétacés et miocènes. A quelque distance se trouve le village d'Asitaes et plus au nord les villages de Zarkou, Kitharides, Pirgou bâtis au flanc de la colline et arrosés par des torrents. Tous ces villages sont bâtis sur terrain de même formation géologique que celui où se trouve Gorgolaïni. Plus au nord, enfin, sur une hauteur de 380 mètres d'altitude, le grand village de Saint-Myron domine la vallée. Nous avons limité notre enquête à cette région.

La zone de collines que nous avons étudiée présente la flore

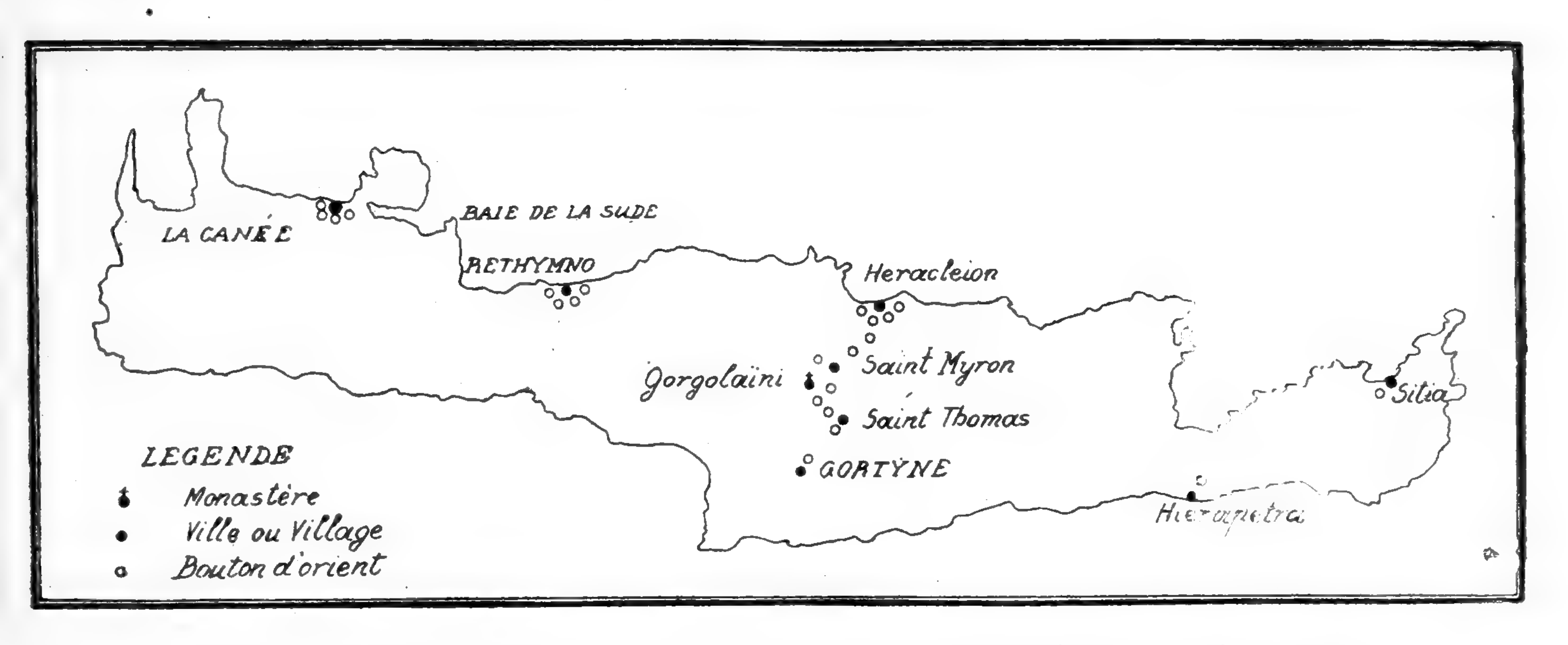


Fig. 3. — Carte de la Crète avec l'indication des principaux foyers de bouton d'Orient.

générale des collines de Crète. Les arbustes et les arbres sont représentés par de nombreuses espèces. La brousse est formée de *Quercus ilex*, *Quercus coccifera*, *Pistacia terebinthus*, *Zizyphus vulgaris*, *Arbutus Unedo*. Aux pentes des collines la vigne et l'olivier sont abondants. Le long des sentiers qui suivent les torrents on observe, à côté de haies d'*Opuntia vulgaris*, la plupart des arbres fruitiers : Noyer, Grenadier, Figuier, Pommier, Poirier. Le Châtaignier, très abondant dans certaines régions de la Crète, manque ou est peu abondant dans la région que nous avons étudiée. Enfin, disséminés sur les collines on trouve le Platane (*Platanus orientalis*), le Chêne (*Quercus sessiliflora*), le Pin (*Pinus halepensis*).

Le choix de Gorgolaïni comme emplacement de notre laboratoire n'a pas été fixé au hasard. Nous savions en effet que plusieurs des villages environnant le monastère étaient contaminés, entre autres, Saint-Myron, Pirgou et Zarkov dont

Cardamatis, comme nous l'avons dit plus haut, fait déjà mention. Nous avons trouvé, au pied même du monastère, à Asitaes, un foyer très intéressant, qui, grâce à la proximité de notre laboratoire, nous a permis de faire des cultures et quelques expériences de transmission.

Le Bouton d'Orient a Asitaes.

Asitaes est un petit village d'environ trois cents habitants. Les maisons grossièrement bâties de moellons, sont serrées les unes contre les autres et s'étagent le long de rues très en pente. Le village est bâti sur le flanc de la colline ; au-dessus de lui s'étale une brousse d'arbustes et de plantes odoriférantes qui sert de pacage aux animaux domestiques, en contre-bas, s'étendent des champs et des vignes parsemées de figuiers et d'oliviers. L'eau du village provient de la montagne d'où elle est amenée par une canalisation rudimentaire. Pas de mares ni de ruisseaux, ce n'est que plus bas, à Pirgou, que serpente un torrent descendu de la colline.

Nous avons interrogé et examiné la presque totalité des habitants du village et vu tous les malades qui se rendaient au monastère pour recevoir des soins ou demander une consultation. Nous avons pu ainsi dépister tous les cas de bouton d'Orient. Ces cas se montent à sept et leur histoire est particulièrement intéressante, car ils se présentent tous sur des membres de la même famille. Nous avons pratiqué dans chaque cas l'examen microscopique qui a toujours été positif et nous avons deux fois isolé en culture pure des *Leishmania* que nous gardons au laboratoire (1).

Voici l'histoire et la description de ces cas :

Constantin Perakis, habitant du village, est marié et a quatre enfants dont un garçon et trois filles. Le fils, âgé de quatorze ans, habite depuis deux ans Héracleion où il est élève à l'Ecole commerciale. Aux vacances de Noël de l'année passée, il vint voir sa famille. A cette date, il est porteur de deux boutons d'Orient contractés à Héracleion : un sur le front, un autre sur le nez. L'enfant reste quelques jours à Asitaes et repart pour Héracleion où

(1) Comme nous l'avons dit plus haut, nous n'avons pas trouvé de Geckos. La recherche des insectes piqueurs pratiquée dans les maisons, particulièrement dans celles où nous avons constaté des cas de bouton d'Orient, nous a fourni en abondance des Phlébotomes et des Punaises.

il est encore ; depuis cette date il n'est pas revenu dans sa famille. Un mois après son départ, soit en janvier 1920, on constate sur le front de la petite Aristea, cinq ans, sa sœur, un petit bouton qui grossit lentement ; il est ensuite accompagné, dans les semaines et les mois qui suivent, de plusieurs autres. Il nous est impossible de faire préciser davantage les dates successives d'apparition. Actuellement, l'enfant porte trois boutons sur le front, un sur la joue gauche, un sur la joue droite, un sur la face antérieure du poignet droit, un sur la face interne de la jambe droite.

Successivement, les deux autres enfants et la mère sont atteints à leur tour : Galliopi, neuf ans, porte trois boutons non ulcérés, un sur la joue gauche, un sur le lobe de l'oreille gauche, un au menton. Ces boutons sont apparus il y a six mois, en février 1920. Elisabeth, sept ans, porte sur la joue gauche un bouton non ulcéré apparu il y a cinq mois en mai 1920. Enfin, la mère porte sur la joue droite un bouton non ulcéré qui date de trois à quatre mois, soit de mai ou avril 1920.

De toute la famille seul le père, que ses travaux agricoles retiennent le plus souvent dehors, est indemne.

Dans la même rue où habite la famille Perakis, du même côté et à *trois maisons d'intervalle*, habite la famille Chaireti, composée du père, de la mère et de deux enfants. Les deux familles sont parentes et les enfants jouent entre eux. Comme leurs cousins, les petits Chaireti, sont porteurs de boutons d'Orient : l'aînée, Marie, porte trois boutons : un sur la joue gauche, un à la région malaire gauche et un sur la face antérieure du poignet gauche. Le début de l'affection remonte à sept mois, soit à janvier 1920. Son frère Manolis, trois ans, porte deux boutons sur la face antérieure du poignet droit, apparus depuis trois mois, soit en mai 1920.

Il n'existe pas un autre cas de bouton d'Orient dans le village. En résumé, un enfant porteur du bouton d'Orient arrive à Asitaes, village indemne, il apporte le germe dans sa famille, qui, petit à petit, se contamine en presque totalité et contamine la famille parente qui habite à quelque distance de là. Aucune propagation dans le reste du village. Ce cas est très suggestif, car il montre, de façon nette, que le bouton d'Orient peut se propager par contact direct sans l'intermédiaire d'insectes piqueurs. Si, en effet, on soulevait l'hypothèse d'un hôte intermédiaire ayant servi à propager le mal, il serait, nous semble-t-il, très difficile d'expliquer pourquoi le père est resté indemne, pourquoi la maladie a sauté par-dessus plusieurs maisons pour venir frapper justement une famille parente de la première, alors qu'elle respectait les autres familles du village. On pourrait objecter qu'il n'est pas moins étonnant que des enfants porteurs de bouton d'Orient n'aient pas contaminé d'autres enfants du village, avec lesquels ils devaient être en contact. Ce paradoxe apparent s'explique fort bien, si l'on admet que le bouton d'Orient est peu contagieux, qu'il faut pour que la transmission ait lieu ulcération du bouton et le plus souvent, porte d'entrée du sujet contaminé tel que notre cas n° 4 en offre un exemple, tel que Laveran en cite de nombreux dans son traité classique. Ici même, en Crète, nous avons trouvé d'autres faits qui, moins probants que le précédent, lui apportent cependant une confirmation. A Zarkou, malgré une recherche très serrée, facilitée par les autorités locales, nous ne trouvons dans tout le village qu'un cas de bouton d'Orient. Ce porteur est un enfant, Sanis Phin..., âgé de huit ans ; il présente un bouton sur le front et un sur le menton. Ces boutons datent d'un an. L'enfant a une sœur, Marie Phin..., âgée de douze ans, qui est revenue d'Héracleion au village il y a environ un an et demi. Elle portait, à ce

moment, deux boutons d'Orient sur l'avant-bras droit dont on voit, à l'heure actuelle, les cicatrices caractéristiques.

Sur la route de Saint-Myron à Héracleion, à une douzaine de kilomètres de cette ville, se trouve une petite auberge isolée. Cette auberge est tenue par une femme qui ne s'absente jamais. Il y a quelques mois, sa fille quitte le village de Daphnes où elle séjournait et vient la rejoindre, elle porte un bouton d'Orient au front; après quelques mois la mère est atteinte à son tour de la même affection.

Ces quelques exemples suffisent à nous convaincre qu'en Crète le mode le plus fréquent sinon unique de propagation du bouton d'Orient est la contagion directe. D'autre part l'extrême rareté ou l'absence de Geckos, l'absence de Dromadaires en foyers importants vont à l'encontre des hypothèses faisant de ces animaux des réservoirs de virus du bouton d'Orient. Ces constatations zoologiques s'accordent avec les expériences négatives faites sur le Gecko par Nicolle, Langeron, et l'un de nous (1), et sur le Dromadaire par Nicolle (2). Selon toute vraisemblance, en Crète le réservoir de virus est l'homme.

Nous ne pouvons, sur quelques faits, discuter toutes les hypothèses faites sur le rôle joué par les insectes piqueurs et par les animaux réservoirs de virus. Faisons remarquer seulement que notre observation d'Asitaes montre que la localisation du bouton d'Orient aux parties découvertes s'allie parfaitement avec une transmission par contact direct. Et nous pensons avec Laveran que si « la contagiosité du bouton d'Orient a été contestée par un grand nombre d'auteurs, cela tient à ce que les conditions sont souvent défavorables à l'observation des faits de contagion ».

Il reste évidemment bien des points obscurs tels que la rareté ou l'absence de boutons d'Orient dans les oasis sahariennes situées en plein sable (Tozeur et la région du Souf). Mais se baser sur ces faits pour soutenir qu'une cause locale d'ordre biologique (insectes piqueurs ou réservoir de virus) est commune à divers foyers conduirait à des conclusions difficilement soutenables. Il faudrait admettre qu'entre Gafsa, par exemple,

(1) Ch. Nicolle, G. Blanc, M. Langeron. Recherches expérimentales sur le rôle du Gecko dans l'étiologie du bouton d'Orient. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1920, **13**, p. 508-511.

(2) Ch. Nicolle, La question du réservoir du virus du bouton d'Orient. Hypothèse du Gecko. Hypothèse du Chameau. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1920, **13**, 511-515.

et Héracleion il existe de tels facteurs communs alors qu'ils n'existent pas entre Gafsa et Tunis d'une part et Héracleion et Athènes d'autre part. En fait, aucune constatation zoologique ne permet actuellement de se ranger à cette hypothèse. Pour tout accorder, il faudrait admettre que le virus crétois n'est pas le même que le virus africain. C'est une question que nous espérons élucider plus tard. Quant à l'existence, en dehors des foyers de bouton d'Orient, de cas ectopiques, elle peut s'expliquer par le peu de contagiosité de la maladie. Dans une agglomération l'apport d'un cas ne suffit pas à créer un foyer, il faut un apport constant de virus pour créer l'endémie. Nous l'avons observé en Crète où, en dehors des grands centres tels que la Canée, Rethymno et Héracleion, foyers permanents, il existe de petits foyers momentanés. Ces petits foyers sont fréquents dans la région qui relie Héracleion à la plaine de Messara.

Expérimentation.

Comme beaucoup d'autres observateurs nous avons constaté la fréquence des Mouches sur les boutons ulcérés. Nous avons tenté d'établir expérimentalement si, comme l'écrivait Laveran en 1880, ces diptères pouvaient avec leur trompe et leurs pattes disséminer le virus. Nous avons suivi la technique employée par Nicolle, Cuenod et l'un de nous dans l'étude expérimentale du trachome (1) :

Le mercredi 25 août, nous faisons avec une curette à chalazion un curettage profond de deux boutons d'Orient, l'un siège sur la joue droite et l'autre sur la main gauche de Marie Ch..., du village d'Asitaes. Le produit obtenu est broyé stérilement et additionné d'environ 1 cent. cube de liquide de condensation de gélose N.N.N. préparée depuis deux jours. Dix-sept Mouches recueillies au monastère sont mises en contact avec le produit de broyage. Chaque mouche est placée dans un tube en contact avec une forte goutte du produit, ses pattes sont souillées abondamment ainsi que sa tête. Une goutte du produit de broyage étalée, fixée et colorée montre d'abondantes *Leishmania*. Les Mouches restent dans leur tube pendant trois heures de 9 heures du matin à 12 heures. Puis elles sont remises dans une cage. A 5 h. 30 du soir, les Mouches sont retirées ; les pattes et la tête coupées sont broyées stérilement dans quelques gouttes de liquide de condensation de milieu N.N.N. Nous nous inoculons réciproquement cette émulsion dans le

(1) Ch. Nicolle, A. Cuenod, G. Blanc, Démonstration expérimentale du rôle des Mouches dans la propagation du trachome. *C. R. Acad. des Sciences*, 1919, **169**, p. 124.

derme de la région sus-épitrochléenne gauche. Aucun de nous n'a eu précédemment de bouton d'Orient. La piqûre est suivie d'une légère réaction œdémateuse accompagnée d'un prurit violent. Œdème et prurit persistent plusieurs semaines et disparaissent totalement. Actuellement, soit quatre mois après l'expérience, aucun bouton n'est apparu aux lieux d'inoculation.

CONCLUSION

Le bouton d'Orient est très répandu en Crète, ses principaux foyers sont les villes de la côte septentrionale : La Canée, Rethymno, Héracleion. Il se rencontre dans toute la région qui s'étend d'Héracleion à la pleine de Messara, il existe à Hérapetra. Dans l'est on le trouve, mais rarement à Sitia; il n'existe pas ou est très rare à l'ouest dans la région haute.

A la Canée, le bouton d'Orient est particulièrement fréquent dans les quartiers resserrés de la ville ancienne.

En Crète, l'homme paraît être le seul réservoir de virus, le Gecko et le Dromadaire ne semblent jouer aucun rôle.

Les constatations épidémiologiques tendent à prouver que le bouton d'Orient se transmet par contact direct sans l'intervention d'un insecte piqueur.

Les Mouches contaminées depuis plus de cinq heures ne peuvent transmettre mécaniquement le bouton d'Orient.

APPENDICE

Notre ami Roubaud a bien voulu déterminer les Insectes piqueurs que nous avons recueillis à La Canée et à Asitaes. Ils appartiennent aux espèces suivantes :

A La Canée : *Phlebotomus papatasii* Scopoli, très commun.
Phlebotomus Sergenti Parrot, un exemplaire mâle capturé dans la chambre de l'un de nous.
Stegomyia fasciata (Fabricius), très commun dans les chambres de notre hôtel.
Anopheles maculipennis (Meigen). A cette espèce paraît se rapporter une jeune larve capturée dans le Cladiso.

A Asitaes : *Phlebotomus papatasii* Scopoli, abondant dans les maisons.
Phlebotomus Sergenti Parrot. Un exemplaire mâle capturé dans la maison où habite la famille Chaireti dont les deux enfants sont porteurs de boutons.

SUR LES LAITS INFECTÉS PAR LE STREPTOCOQUE DE LA MAMMITE DES VACHES LAITIÈRES (1)

par H. KUFFERATH

Ingénieur agricole (Gembloux), Docteur ès Sciences,
Ex-chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Bruxelles,
Directeur du Laboratoire intercommunal de Bruxelles.

M. Léon Delange, ex-directeur du Laboratoire intercommunal de Bruxelles (lequel Laboratoire fut créé pendant la guerre pour aider la répression des fraudes des produits alimentaires), eut, au début de son action, pour principale mission, le contrôle du lait dans l'agglomération bruxelloise.

Ce contrôle fut aussi complet que possible, les laits furent vérifiés non seulement au point de vue chimique, mais aussi aux points de vue bactériologique, hygiénique et microscopique. Habituellement, les laboratoires d'analyses ne pratiquent, en Belgique, que les analyses chimiques. La direction du Laboratoire intercommunal entra résolument dans une voie nouvelle, les constatations bactériologiques, hygiéniques et microscopiques étant indispensables pour une appréciation correcte de la valeur des laits destinés à la consommation humaine. Nous fûmes chargés de réaliser cette partie du contrôle laitier, question délicate à résoudre, n'ayant à notre disposition que de rares renseignements sur les techniques à mettre en œuvre. Bien plus, la Belgique était occupée par l'ennemi, toutes les communications coupées avec les pays civilisés rendaient impossible une documentation sur la matière. C'est dans ces pénibles conditions que nous nous sommes attelé à la tâche. Il nous fallut plus de deux ans pour mettre au point ce contrôle.

La création de vacheries par la Coopérative de l'agglomération

(1) Cette note a fait l'objet d'une communication au Congrès anglo-belge d'hygiène à Bruxelles, en mai 1920.

bruxelloise (Section du Comité National) fut pour nous d'une grande utilité, car elle nous permit de suivre de très près la production laitière, d'obtenir des échantillons normaux de lait obtenus dans des conditions hygiéniques très rigoureuses.

Le contrôle du lait fut aussi complet que possible, le Laboratoire intercommunal vérifiait non seulement le lait débité à Bruxelles par le département des laiteries, mais aussi, et d'une façon très complète, le lait aux lieux mêmes de production. Grâce à l'organisation d'un service de prélèvements journaliers, toutes les bêtes laitières des vacheries du département laiteries furent vérifiées. Il nous suffira de dire ici que, du 1er octobre 1915 au 30 septembre 1918, il fut pratiqué 16.465 examens hygiéniques, non compris les analyses bactériologiques complètes et les examens microscopiques (1).

Ces chiffres indiquent, mieux que tout autre commentaire, l'importance qu'eut le contrôle du lait de chaque vache (*huit cents environ*) dans l'organisation créée par le Laboratoire intercommunal. Sur ces 16.465 laits, 1.097 échantillons, soit 6,6 p. 100, étaient anormaux et dans 172 cas, soit 1 p. 100, on a trouvé des streptocoques de la mammite des vaches laitières. 82 vaches sur 800 environ étaient infectées de streptocoques. Le fait que 10 p. 100 des vaches de l'exploitation étaient atteintes de mammite streptococcique montre quelle importance doit être attribuée à cette maladie et les dangers réels qu'elle présente pour la santé publique.

Le streptocoque que nous avons trouvé dans tous les cas de mammite nous paraît bien caractérisé. Typiquement, on trouve dans les laits pathologiques un grand nombre de leucocytes. Il suffit, pour s'en convaincre, d'étaler une goutte de lait suspect sur une lame, de sécher, fixer et colorer au bleu de méthylène pour constater un notable accroissement du nombre des globules blancs comparativement à un lait normal. Lorsque l'on centrifuge le lait, et que l'on colore le dépôt, on a une concentration des germes microbiens que l'on reconnaît aisément. Le streptocoque se présente sous forme de longues

(1) H. Kufferath, Rapport sur les contrôles bactériologiques, hygiéniques et microscopiques effectués au Laboratoire International de l'agglomération bruxelloise pendant les années de guerre 1915 à 1918. *Annales de Gembloux*, 1920, **26**, p.15.

chaînettes d'éléments arrondis, légèrement aplatis transversalement, parfois de grandeur irrégulière. Lors de la division, les cocci restent groupés par deux et l'ensemble rappelle un peu la forme des gonocoques.

Les chaînettes peuvent être remarquablement longues, elles sont enroulées en pelotes irrégulières plus ou moins volumineuses, formant avec les globules blancs des masses agglomérées. Cet aspect est tout à fait caractéristique. Très généralement une gaine gélatineuse très nette entoure les filaments streptococciques. A côté des éléments en chaînettes, on en trouve d'autres, plus courts, formés de deux à huit cocci. Ce microbe se colore très bien par toutes les couleurs ; bleu de méthylène, violet de gentiane, fuchsine phéniquée, toluidine (Bordet), ils prennent le Gram. La forme longue du streptocoque est aisément reconnaissable, elle se remarque au début de l'infection et au moment où celle-ci a atteint son apogée. Plus tard, au temps de la guérison, ou lorsque la maladie devient chronique, ces formes longues tendent à disparaître et l'on ne trouve plus que des formes courtes ou simplement des diplocoques.

On a voulu distinguer ces formes courtes des formes longues chez les streptocoques de la vache. Ce sont deux aspects d'un même microbe. En suivant la forme des streptocoques dans le lait d'un même trayon infecté, on note aisément l'évolution des formes, longues d'abord, courtes finalement, avec tous les stades intermédiaires. Quand plusieurs trayons sont atteints, mais que l'infection s'est faite à des moments différents, on trouve toutes les formes décrites côte à côte. Il s'agit évidemment des laits sortant du trayon, car si l'analyse est tardive, et qu'il y a multiplication des diplocoques banaux du lait, il est impossible de distinguer ces diplocoques des formes courtes des streptocoques. Il en est de même quand le lait renferme des streptocoques lactiques banaux. Ces derniers se rencontrent régulièrement dans le lait récolté avec tous les soins de propreté désirables, ils sont même un indice favorable. On les isole facilement en employant la technique que nous avons décrite pour la recherche du *B. coli* (1). Dans ces conditions, les streptocoques banaux

(1) LÖHNIS. *Précis de bactériologie agricole et de technique expérimentale*, traduit par H. Kufferath. Ed. Lamertin. Bruxelles, 1912, p. 87.

poussent dans les mêmes conditions que le *Bacterium coli* (bouillon phéniqué et gélose minéralisée lactosée); cultivés en bouillon de viande, avec ou sans sucres, ils produisent un trouble abondant et persistant alors que le streptocoque pathogène de la mammite ne donne qu'un léger dépôt blanchâtre et laisse le liquide surnageant limpide.

En cultures, le streptocoque de la mammite pousse identiquement comme les streptocoques isolés chez l'homme : gouttes de rosée sur gélose ordinaire, colonies minimes non liquéfiantes sur gélatine au bouillon, la gélose sanglante est hémolysée, le lait coagule moins rapidement qu'avec les streptocoques banaux. Alors que sur la gélose, les streptocoques de mammite poussent en donnant des diplocoques, ils conservent leur forme en chaînettes, dans le liquide de condensation. Ces formes, ainsi que celles cultivées en bouillon, ne se distinguent en rien des streptocoques pathogènes humains.

Pathogénéité pour l'organisme.

Un exemple malheureux et récent démontre une fois de plus que le streptocoque de la mammite produit des entérites mortelles pour l'homme. Ce microbe tue le chat, ainsi que le prouve l'observation d'animaux ayant bu du lait infecté. Il n'est guère pathogène pour le cobaye et le lapin, ce dernier supporte très bien l'inoculation de 1/2 cent. cube de lait dans la veine.

Nous ne désirons pas faire ici l'historique de l'étude des streptocoques de la mammite des vaches. Ce problème a été compliqué à plaisir ; certains auteurs n'ont pas su distinguer ce streptocoque des streptocoques lactiques normaux du lait, d'autres plus nombreux ont tenté de le différencier des streptocoques pathogènes de l'homme et des animaux, sans trouver des caractères bien tranchés permettant d'en faire une espèce spéciale, d'autres enfin ont montré que ce streptocoque peut produire des infections chez l'homme (entérites, angines) et que, réciproquement, le streptocoque d'origine humaine peut déterminer une mammite expérimentale. Il y a là matière à beaucoup d'opinions contradictoires et à discussions.

Mais, si nous abandonnons ces théories et que nous nous plaçons sur le terrain pratique du contrôle du lait, le problème

peut être ramené à quelques faits : il y a lieu tout d'abord de distinguer les streptocoques lactiques banaux du streptocoque de la mammite. Il faut constater, en outre, que le streptocoque de la mammite présente en culture toutes les réactions des streptocoques de l'homme et des animaux, et qu'il n'y a aucune possibilité de les différencier par ces propriétés. Finalement on doit constater que le streptocoque de la mammite produit chez la vache une affection très particulière, cliniquement très bien caractérisée. On a peut-être perdu de vue ce fait dans les nombreuses discussions sur ce sujet. C'est en effet une chose remarquable de constater une infection aussi aiguë et aussi localisée, au point qu'un seul trayon peut être atteint et les voisins rester indemnes. A noter l'absence de réaction fébrile dans tous les cas observés. Alors que les autres espèces de streptocoques produisent des suppurations et des septicémies mortelles, nous n'avons jamais connaissance de tels accidents chez la vache. La maladie semble avoir une origine externe, elle débute d'une façon insidieuse, on ne peut la déceler à ce moment que par l'examen du dépôt leucocytaire et la vérification microscopique des germes dans le lait (1). Très rapidement l'infection devient aiguë, le lait se transforme, devient caséeux, filant, ou bien est entièrement transformé en un liquide purulent, parfois il est sanguin. Le pis est gonflé, chaud, rougeâtre, sensible. La fin de la maladie amène le tarissement de la glande mammaire ; dans certains cas, la mamelle s'atrophie, se vide par nécrose des tissus. Dans d'autres cas, il se forme un tissu conjonctif cicatriciel, la mamelle devient engorgée et volumineuse. Dans tous les cas, l'activité fonctionnelle est annihilée.

Les relations entre la présence de streptocoques, l'élévation du taux leucocytaire du lait et l'apparition de la mammite avec ses caractères cliniques sont d'une constance absolue, au point qu'un contrôle régulier des vacheries permet de signaler, au vétérinaire traitant, les bêtes à surveiller et les trayons suspects avant que tout signe extérieur dénonce la maladie.

L'infection streptococcique modifie le plus généralement le

(1) H. Kufferath, A propos de la recherche des leucocytes dans le lait. Ces *Annales*, 1919, p. 420.

lait d'une façon profonde. Les caractères chimiques de ces laits pathologiques ne sont guère connus ; nous donnons ci-dessous quelques analyses de ces laits.

VACHE ET TRAYON — Aspect du lait	LSM 12 PG — Apparence laiteuse normale	LSM 14 PG — Sérum jaunâtre, dépôt fibrineux purulent	ST 53 PG — Aspect laiteux sang	B. 9 — Aspect anormal sang	N. 2 — Lait purulent	BO 38 — Aspect normal, vache en voie de guérison	BO 23 — Aspect normal, bête guérie. Sang	N. 5 — Lait normal Moyenne de 6 analyses
Taux leucocytaire 0/0.	60	40	6	5	10	1,2	0,5	0,25
Densité . . .	1017	1029	1024,4	1021	1021,7	1027,8	1030,0	1032,0
Beurre 0/0. .	0,5	1,70	2,3	1,6	0,6	3,85	2,0	3,70
Extrait sec 0/0	5,5	9,55	9,1	7,06	»	11,58	10,16	12,82
Extr. sec dégraissé 0/0.	4,55	7,85	6,8	5,46	»	7,73	8,16	9,09
Cendres 0/0.	»	»	»	»	»	0,716	»	0,717
Réfraction. .	»	»	»	»	26	35,70	»	38,21
Acidité en soude 1/10 N pour 100 c.c (Cl).	10	55	13,5	20,5	»	17,5	18,5	19,5

Les divers laits pathologiques dont nous venons de donner l'analyse montrent de profondes altérations de constitution chimique : la densité, le beurre, l'extrait sec dégraissé, la

Analyses bactériologiques de

	LAITS CRUS ASEPTIQUES				
	INDIVIDUELS		LAITS DE MÉLANGE		
	STI 36	N. 6	Karr.	Vin. V	Vi
Germes par centimètre cube . .	42.030	23.580	327.411	110.943	107.
Leucocytes p. 100.	1,0	3,0	0,5	0,3	0
Catalase en centimètres cubes .	10	—	4	10	
Réduit après... heures	21 h. 1/2	—	20	13 1/4	8
Coagulé à 37° après... heures. .	29 h. 1/2	17	28 1/2	20 3/4	11

réfraction ont des valeurs bien inférieures en général à celles des laits normaux. Les laits des bêtes guéries BO 38 et BO 23, par exemple, ont une composition presque normale.

Nous avons également eu l'occasion de faire des analyses bactériologiques complètes de laits à streptocoques ; quelques résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Ces diverses analyses montrent que les caractères bactériologiques ne permettent de reconnaître la présence de streptocoques dans les laits que par l'examen microscopique du dépôt leucocytaire. Généralement la présence de streptocoques de la mammite est en corrélation avec un dépôt de globules blancs anormal ; il y a pourtant des cas où sa valeur étant normale de 0,1 à 0,40 p. 100, on trouva néanmoins des streptocoques. La méthode est si précise, que, par exemple, pour des laits commerciaux, il fut possible de faire constater par le vétérinaire l'existence de mammite chez les producteurs de lait et d'interdire, conformément à la loi, la mise sur le marché de ces laits pathologiques.

Ces considérations démontrent l'importance primordiale du contrôle hygiénique des laits et de la recherche systématique des streptocoques par l'examen microscopique. Dans ce but, le Laboratoire intercommunal a organisé un service spécial de prélèvement pour la surveillance des vacheries du département laiteries. Chaque jour les préleveurs assistent à la traite dans une des vacheries, et ils prélèvent 40 cent. cubes de lait pour

rmant des streptocoques.

	LAITS COMMERCIAUX				LAITS STÉRILISÉS		
3r	3244	7050	7174	2269	2331 *	2512	2696
.936	43.490	35.676	377.118	133.200	0	0	50
3	0,6	1,3	5	0,2	0,7	1,5	1,0
	0	0	0	0	0	0	0
:	16	6	3/4	9 1/2	19	∞	∞
:/4	18 1/2	6	7	7	24	∞	∞

le contrôle hygiénique de chacune des bêtes laitières. A chaque visite, on prélève 40 à 50 échantillons et l'on établit un roulement de manière à ce que chaque vache soit vérifiée au moins deux fois par mois. Un préleveur peut assurer le contrôle de 400 à 500 vaches, pourvu qu'elles soient groupées dans des vacheries assez importantes (40 à 100 vaches par ferme).

Dès que le lait arrive au Laboratoire, l'assistant en fait l'analyse hygiénique, 20 cent. cubes de lait sont centrifugés dans les tubes à leucocytes que nous avons décrits (*loc. cit.*). On note le dépôt formé. Dans la pratique, nous employons une centrifuge Cerber à 16 tubes; il suffit d'avoir une cinquantaine de tubes à leucocytes pour un travail rapide. Certains auteurs avaient recommandé, pour faciliter le dépôt des globules blancs, de chauffer préalablement à 70°, avant la centrifugation. Nous n'avons pas suivi cette indication, le turbinage pendant cinq minutes se fait à la température ordinaire (15 à 20°).

Cette façon d'opérer donne des résultats inférieurs à ceux obtenus par chauffage, ainsi que le montrent les essais suivants :

Dépôt leucocytaire observé.

	VACHE N° 22	VACHE N° 38
Pour le lait à 15-20° C	0,8 p. 1000	2,40 p. 1000
Pour le lait chauffé à 70° C.	1,0 —	3,00 —
Différence.	20,0 p. 100	20,00 p. 100

Les résultats donnés par la centrifugation à froid sont donc plus faibles.

En pratique, le chauffage des laits constitue un embarras pour la rapidité des opérations ; d'ailleurs, à moins d'avoir une turbine, chauffée, les laits se refroidissent par suite du mouvement centrifuge. On se rappellera ces remarques pour l'appréciation des résultats.

Nous considérons qu'un lait est suspect, quand son dépôt leucocytaire après centrifugation à la température ordinaire est de 0,6 p. 100.

Les dépôts suspects servent à faire une préparation microscopique par frottis et sont colorés au bleu de méthylène. Pour compléter ces renseignements, les 20 cent. cubes restants de l'échantillon soumis à l'analyse servent à rechercher la catalase quand le dépôt est inférieur à 1,5 p. 1.000.

Pour faire cette réaction, on ajoute 5 cent. cubes d'eau oxygénée à 1 p. 100 à 15 cent. cubes de lait. On recueille dans une éprouvette graduée l'oxygène dégagé. Un lait normal ne donne pas plus de 3 cent. cubes d'oxygène après deux heures.

Les vaches dont le lait est déclaré suspect à l'examen hygiénique sont signalées au préleveur qui récolte au contrôle suivant le lait de chacun des trayons et note les quartiers correspondants : A. G., trayon antérieur gauche ; A. D., antérieur droit ; P. G., postérieur gauche ; P. D., postérieur droit.

Sur chacun de ces laits, on pratique les recherches indiquées et l'on parvient ainsi à indiquer au directeur de laiterie les trayons suspects dont le lait doit être rejeté de la consommation. L'examen microscopique accompagne chacune de ces analyses qui fournissent ainsi des renseignements circonstanciés sur la valeur du lait au point de vue hygiénique.

Une analyse plus complète au point de vue hygiénique pourrait comprendre l'épreuve de la réductase, mais l'expérience nous a indiqué que cette recherche est peu importante et ne vient que confirmer les résultats précédents.

D'ailleurs, le laboratoire a dû restreindre ses prises d'échantillons à 40 cent. cubes, les quantités de lait prélevées par les services étant importantes pour un grand nombre de bêtes. Si l'on compte que pour toutes les analyses à effectuer, le Laboratoire utilise journellement environ trois litres de lait prélevé, cela fait un millier de litres par an.

Grâce au prélèvement systématique d'échantillons et à une organisation devenue très complexe, nous avons pu suivre, pour chacune des vacheries et pour chaque bête laitière, la situation sanitaire. Nous ne ferons ici que quelques remarques générales relatives à la question des streptocoques dans le lait.

Tout d'abord, remarquons qu'il y a des vacheries où l'on n'a jamais constaté de mammites à streptocoques, alors que d'autres présentent cette maladie à l'état endémique. Cette infection a

une importance économique qui n'a pas été suffisamment mise en évidence. Il suffit de dire que pour un troupeau d'environ 800 vaches, on a trouvé en trois ans 82 bêtes atteintes de streptocoques dont la présence a été contrôlée microscopiquement. Ce qui représente 10 p. 100 du nombre total des bêtes en lactation.

Ces chiffres démontrent que la mammite streptococcique cause de grandes pertes à la laiterie. Economiquement, une vache atteinte de mammite ne donne plus de lait consommable pendant six semaines au moins ; en comptant 10 litres par jour, cela fait 480 litres perdus pour l'exploitation. Mais pour l'hygiéniste, les bêtes atteintes doivent être considérées comme un danger perpétuel pour le consommateur ; même guéries cliniquement, elles restent dangereuses et peuvent propager l'infection dans l'étable et le lait débité. Il serait donc indispensable d'éliminer immédiatement du troupeau toute bête présentant de la mammite à streptocoques. Cette règle n'est pourtant pas observée, nous avons noté de nombreux cas où les bêtes signalées comme infectées de streptocoques étaient maintenues dans les étables et leur lait utilisé, malgré l'avis défavorable du Laboratoire intercommunal, pour la consommation par des bébés et des malades.

Une enquête que nous poursuivons depuis plusieurs années nous a montré que la proportion des laits suspects (dépôt leucocytaire supérieur à 6 p. 1.000) et de laits à streptocoques varie suivant le temps. Il y a des moments de l'année où dans une

ANNÉE	JANVIER	FÉVRIER	MARS	AVRIL	MAI	JUIN	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	OCTOBRE	NOVEMBRE	DÉCEMBRE
	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
1917	»	»	»	»	»	»	»	12,6	6,2	2,8	3,4	3,4
1918	4,1	12,0	5,7	6,5	8,7	5,8	8,2	5,9	5,1	»	4,4	7,8
1919	12,8	19,7	13,7	12,0	9,7	9,9	13,2	8,5	10,2	13,8	11,7	9,1
1920	15,1	11,4	13,9	11,9	»	»	»	»	»	»	»	»
Moyennes..	**10,9**	**16,1**	**11,7**	**10,9**	**9,4**	**8,0**	**11,4**	**8,4**	**6,7**	**9,4**	**6,1**	**6,9**

exploitation, le nombre des vaches atteintes est plus grand qu'à d'autres époques. C'est ce que l'on constatera d'après les tableaux suivants basés sur un total de 26.259 examens hygiéniques (depuis le mois d'août 1917 jusqu'au mois de mai 1920). Les chiffres pour le pourcentage de laits suspects soumis à un examen hygiénique sont contenus dans le tableau ci-dessus).

Pour 26.259 examens dn dépôt leucocytaire, on constata 2.495 suspects, soit 9,5 p. 100 comme moyenne générale. Ce chiffre est bien supérieur à celui que nous avions trouvé antérieurement (1). Au début de l'organisation des laiteries, le nombre de laits suspects fut de 5 p. 100, jusqu'en 1916 et de 6,6 p. 100 pour la période de guerre 1915-1918. Cela nous indique que pendant la période si critique de l'occupation, les conditions de bon état des laitières furent bien meilleures qu'après l'armistice. On aurait dû s'attendre au contraire. Ces chiffres trahissent une situation générale qui demande une sérieuse attention des hygiénistes.

Si l'on établit le nombre de vaches nouvellement atteintes de mammite, sans compter celles antérieurement infectées, on obtient les valeurs suivantes :

Nombre de vaches nouvellement atteintes de mammite.

ANNÉE	JANVIER	FÉVRIER	MARS	AVRIL	MAI	JUIN	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	OCTOBRE	NOVEMBRE	DÉCEMBRE
1917	0	1	3	2	5	1	1	1	2	1	1	2
1918	3	6	3	6	13	6	3	2	5	1	7	7
1919	26	16	5	14	9	2	2	6	1	4	5	4
1920	6	10	8	4	»	»	»	»	»	»	»	»
Moyennes	12	8	5	7	9	3	2	3	3	2	4	4

Rappelons que durant cette période de trois années, il y avait de 600 à 800 vaches en observation, mais par suite des mutations, achat de nouvelles bêtes, vente du bétail, on peut

(1) *Annales de Gembloux*, janvier 1920, p. 28.

compter qu'il y eut environ 1.000 bêtes surveillées sur lesquelles 209 furent trouvées atteintes de mammites streptococciques. Pendant la période de guerre, il y eut 10 p. 100 de bêtes atteintes de cette maladie. Ces chiffres indiquent éloquemment le grand danger que présente l'infection à streptocoques et indiquent la nécessité d'un contrôle permanent et vigilant pour dépister les mammites. Les hygiénistes savent quels ravages peuvent causer les streptocoques chez les enfants et chez les organismes débiles. L'entérite provoquée par ces microbes chez les enfants peut être mortelle et en tout cas présente toujours de la gravité. Cette question étant bien établie en médecine infantile, nous n'insisterons pas sur ce point. Ce que nous venons de dire indique l'importance de la question.

Nos constatations permettent de préciser les mesures à prendre pour atténuer les dangers d'infection.

La première règle à observer d'une façon stricte est l'élimination immédiate de toute bête présentant des streptocoques dans le lait. Le système de surveillance des vaches laitières que nous avons préconisé et appliqué au Laboratoire intercommunal donne des garanties suffisantes pour la mise en évidence des streptocoques de mammite. Ce procédé est très sensible et permet de signaler au service vétérinaire les mammites streptococciques débutantes. A notre avis, il vaut mieux écarter immédiatement du troupeau toute bête, même atteinte légèrement, car nous avons fréquemment observé qu'une infection légère réapparaît toujours au bout d'un certain temps. Nous avons également constaté qu'on trouve assez souvent des streptocoques dans le lait de vache, à la fin de la période de lactation, quand on ne les tarit pas à temps et que l'on veut profiter des dernières portions de lait fournies par la bête. Dans ces cas, une infection passagère se produit, mais au moment du vêlage elle reprend une activité nouvelle et, précisément, quand la vache donne le plus de lait. Ce lait étant infecté, il en résulte une perte sensible pour l'exploitation.

On ne doit pas conserver les bêtes atteintes, d'abord de crainte d'infection pour les bêtes saines et ensuite à un point de vue économique. L'évolution d'une mammite bien soignée dure de trois à six semaines, parfois plus; ce lait, étant un danger continuel d'infection pour les consommateurs, doit être rejeté

de la vente, ainsi que le veut d'ailleurs la loi. Ce serait un crime, si, étant prévenu de l'état d'infection streptococcique d'une vache, l'exploitant autorisait la mise en vente de ce lait. La guérison des mammites demande de grands soins, des médicaments, des frais de toutes sortes qui viennent augmenter la perte due au rejet du lait. Dans ces conditions, rien qu'en se plaçant à un point de vue économique, il est indiqué d'éliminer toute bête atteinte. On l'engraissera et on l'enverra à l'abattoir.

Il est aussi indiqué, lorsque l'on introduit de nouvelles laitières dans le troupeau, de vérifier soigneusement la qualité hygiénique et bactériologique de leur lait en leur faisant subir un passage dans une étable de quarantaine.

L'examen du dernier tableau (voir ci-dessous) nous montre que l'infection streptococcique est plus ou moins forte suivant le moment de l'année. On y verra par exemple, que c'est de juin à octobre, en été, que l'on observe le moins de vaches nouvellement infectées. Au contraire l'hiver et la période de stabulation amènent une recrudescence de la maladie dont le plus grand développment s'est produit durant les mois de janvier et février.

La courbe de la moyenne indique bien ces deux périodes principales de l'infection : forte en hiver, le maximum est en janvier ; faible en été, le minimum est en juillet. Entre ces deux extrêmes, la courbe présente un maximum secondaire en mai et un minimum secondaire en octobre. Cette forme particulière de la courbe se retrouve chaque année, mais les sommets sont légèrement déplacés suivant les conditions climatériques générales, mais sans s'écarter sensiblement des positions indiquées par les valeurs moyennes. Pratiquement on déduit de ces courbes que c'est la période estivale : l'été, le pâturage en plein air qui favorise le plus la bonne santé du bétail. Au contraire, la période hivernale de stabulation présente les conditions les plus défavorables.

Les efforts des exploitants devront tendre à rendre cette période la moins nocive possible ; c'est pendant cette période que la surveillance hygiénique du lait devra être la plus vigilante. Un des facteurs principaux est celui dû aux intempéries ; on s'efforcera à cet effet d'endurcir les bêtes, de les rendre résistantes au froid. Il est très possible d'y arriver ainsi que

l'indique M. Robertson (1), pour des vaches hollandaises en les faisant sortir tous les jours d'hiver. Il y a évidemment tout un ensemble de mesures à prendre pour diminuer la sensibilité des bêtes aux streptocoques pendant l'hiver, elles porteront sur la stabulation, l'alimentation, la manière générale de soigner le bétail. Chaque cas doit être envisagé. Il nous suffira ici d'attirer l'attention des hygiénistes sur ce point.

L'examen des courbes nous montre que vers la fin de l'hiver se produit une recrudescence de la maladie, en mai, c'est-à-dire au moment où les bêtes sont remises en prairie. L'inclémence du temps, son action sur les animaux habitués à vivre dans des locaux fermés et d'autant plus sensibles semble être une cause déterminante du maximum secondaire d'infection. Il y aura lieu, en conséquence, de prendre des précautions à ce moment. Il en est de même au mois d'août, quand les chaleurs sont les plus fortes ; à ce moment aussi les bêtes sont plus sensibles à l'infection, on les abritera contre les chaleurs, on les abreuvera abondamment, etc.

Une mesure à prendre pour diminuer la propagation de la maladie, et qui serait à tenter, serait de vacciner les vaches contre le streptocoque de la mammite.

Nous avons fait quelques essais de vaccination de vaches fortement infectées ; dans la plupart des cas il n'y eut pas de résultat net. Il est vrai de dire que nous n'avons pas été secondés, comme nous eussions dû l'être, par le service technique qui ne nous donna pas l'autorisation demandée de continuer nos tentatives de vaccination. Mais cette question mérite d'être reprise, il en résulterait un grand avantage pour le consommateur de lait et pour les exploitants eux-mêmes.

Telles sont, esquissées rapidement, les mesures à prendre pour améliorer la qualité hygiénique des laits considérés spécialement au point de vue de l'infection streptococcique. Si l'on considère que 20 p. 100 des vaches d'un troupeau important ont payé en quatre ans leur tribut à cette maladie, on en conclura que cette infection n'est pas aussi bénigne que l'on croit généralement.

Pour l'hygiéniste, cette maladie spéciale des vaches laitières

(1) G. S. Robertson, The possibilities of the British Friesian cow for dairy purposes. *The Journ. of the Board of Agriculture*, London, mai 1919, **26**, p. 131.

	JANV.	FÉVR.	MARS	AVRIL	MAI	JUIN	JUILL.	AOUT	SEPT.	OCT.	NOV.	DÉC.
Année 1917 :												
1° Nombre d'examens de centrifugation	»	»	»	»	»	»	»	789	592	592	753	669
2° Laits suspects et soumis à l'examen microscopique 0/0	»	»	»	»	»	»	»	12,6	6,2	2,8	3,4	3,4
3° Nombre d'examens avec présence de streptocoques.	0	3	6	4	19	7	3	9	6	1	4	5
4° Nombre de vaches nouvellement infectées.	0	1	3	2	5	1	1	1	2	1	1	2
Année 1918 :												
1° Nombre d'examens de centrifugation	754	579	647	442	492	685	762	1287	1524	—	908	1095
2° Laits suspects soumis à l'ex. microscop. 0/0	4,1	12,0	5,7	6,5	8,7	5,8	8,2	5,9	5,1	—	4,4	7,8
3° Nombre d'ex. avec présence de streptoc. .	6	13	7	12	16	10	7	7	12	4	10	20
4° Nombre de vaches nouvellement infectées.	3	6	3	6	13	6	3	2	5	1	7	7
Année 1919 :												
1° Nombre d'examens de centrifugation	1465	902	1298	1099	1076	775	785	910	771	865	688	600
2° Laits suspects soumis à l'ex. microscop. 0/0	12,8	19,7	13,7	12,0	9,7	9,9	13,2	8,5	10,2	13,8	11,7	9,1
3° Nombre d'ex. avec présence de streptoc. .	45	37	26	23	23	9	15	22	1	17	8	7
4° Nombre de vaches nouvellement infectées.	26	16	5	14	9	2	2	6	1	4	5	4
Année 1920 :												
1° Nombre d'examens de centrifugation . . .	654	621	660	620	719	507	557	676	»	»	»	»
2° Laits suspects soumis à l'ex. microscop. 0/0	15,1	11,4	13,9	11,9	9,7	15,7	10,7	13,3	»	»	»	»
3° Nombre d'ex. avec présence de streptoc. .	11	25	26	28	4	9	3	5	»	»	»	»
4° Nombre de vaches nouvellement infectées.	6	10	8	4	4	3	2	3	»	»	»	»
Moyennes :												
1°	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
2° Laits suspects soumis à l'ex. microscop. 0/0	10,9	16,1	11,7	10,9	9,4	8,0	11,4	8,4	6,7	9,4	6,1	6,9
3° Nombre d'ex. avec présence de streptoc. .	21	19	16	17	15	9	7	11	9	7	7	11
4° Nombre de vaches nouvellement infectées.	12	8	5	7	8	3	2	3	3	2	4	4

présente de l'intérêt par suite des graves conséquences que peut avoir pour l'homme l'ingestion du lait contaminé. Grâce aux recherches du Laboratoire intercommunal de Bruxelles, il fut possible d'établir les règles à suivre pour l'établissement de la surveillance hygiénique des laits ; les chiffres que nous avons donnés fournissent des précisions sur les avantages que l'hygiène de l'alimentation humaine lactée peut retirer d'une telle organisation. Si nous avons pu faire saisir l'importance de ce problème assez spécial, nous serons assez récompensé de nos recherches. Il démontre en tous cas la nécessité d'une surveillance constante du lait vendu par le commerce et l'application dans les laiteries des règles énoncées dans la présente communication.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Mars — N° 3.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . . . France . . . . 45 fr.
— — — — . . . . Union Postale. 55 fr.
Prix du numéro, — — . . . . 4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées.
Les annees 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément
Tables des Matières années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 3

35e ANNÉE MARS 1921 N° 3

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

L'HÉPATITE AIGUE

ÉTUDE PHYSIO-PATHOLOGIQUE DES LÉSIONS INITIALES DE LA CELLULE HÉPATIQUE

par A. NANTA,

professeur agrégé à la Faculté de médecine de Toulouse.

(Avec la planche I.)

Dès que l'étude du protoplasma fonctionnel, puis du chondriome, eut permis de concevoir que l'on pût pénétrer dans la structure intime des cellules glandulaires et saisir les images de l'activité cellulaire dans ses diverses phases, les anatomo-pathologistes n'ont pas manqué d'appliquer les techniques de la cytologie aux modifications structurales pathologiques de la cellule hépatique.

I. — Il semblait en effet jusque-là que les altérations anatomiques correspondant aux troubles graves des fonctions du foie, résumées communément sous le nom d'insuffisance hépatique, fussent caractérisées par des figures de dégénérescence accusées. Du moins les auteurs s'étonnaient quand, à l'autopsie de sujets ayant présenté les signes de l'insuffisance hépatique, ils trouvaient un état d'intégrité remarquable : c'est encore la surprise de bien des cas de spirochétose ictérohémorragique. Et inversement l'ictère grave, qui s'accompagne

de lésions histologiques considérables, montrait que le foie peut encore accomplir quelque travail alors que ses éléments sont devenus méconnaissables.

De sorte qu'on doit concevoir dans bien des cas, qu'à l'insuffisance cliniquement caractérisée, correspondent, non point forcément des dégénérescences qui accusent la mort de la cellule, mais des lésions transitoires, minimes sans doute, réparables parfois, qui traduisent son état de maladie ; et que d'autre part un élément morphologiquement altéré est susceptible encore d'une certaine activité.

Quels signes histologiques peuvent donc correspondre au déficit fonctionnel de la cellule hépatique? Ne les cherchons pas dans une formule d'atrophie ou de dégénérescence : rien n'indique *a priori* qu'une cellule atrophiée par la sclérose ou surchargée de graisse soit incapable de fabriquer du glycogène de neutraliser des poisons, ou d'élaborer de l'urée. Mais si l'on voit immédiatement que l'un des troubles fonctionnels important, celui qui est relatif à la glycogénèse, peut être traduit par une modification histologique, qui sera l'appauvrissement en glycogène, il n'en va pas de même pour le trouble uréopoïétique, par exemple; et l'on peut se demander comment à l'autopsie de sujets qui présentaient un abaissement du coefficient azoturique on retrouvera dans le foie, s'il n'y a pas destruction d'une partie de l'organe, les marques du déficit fonctionnel.

II. — C'est ici que l'étude du chondriome a donné l'espoir d'une réponse plus satisfaisante.

On sait en effet que la cellule glandulaire possède dans son protoplasma figuré des corpuscules appelés mitochondries dont l'ensemble constitue le chondriome, qui sont les agents de la sécrétion cellulaire et d'une manière générale de l'activité cellulaire; ce sont eux qui peuvent former ou transformer ou retenir, selon le cas, graisses glycogène, pigments, etc... On peut saisir, d'après leur état, les étapes de la transformation chimique intime, qui s'accompagnent d'ailleurs de modifications structurales du noyau et de l'ensemble du protoplasma. Si bien qu'il y a des signes généraux de l'activité ou de l'inaction cellulaire, manifestés par des modifications des

mitochondries, du cytoplasme, du noyau et aussi des enclaves c'est-à-dire des produits élaborés.

Notons que dans le foie, qui paraît être en état d'activité physiologique continue, et où bien des observateurs n'avaient pas vu de protoplasma fonctionnel apparaissant à l'occasion des actes digestifs (Gilbert), les images de l'activité physiologique, déjà incertaines, ne prêtent guère à comparaison avec celles de l'activité pathologique ou de l'inaction.

Cependant plusieurs auteurs, déterminant des intoxications expérimentales (Fiessinger, Rathery, Launoy), ont précisé l'aspect des altérations initiales que les techniques anciennes n'avaient pu mettre en évidence.

Ce sont ces petits signes histologiques qu'il convient d'abord de passer en revue.

III. — Lésions expérimentales.

Les premiers signes de l'hépatite toxique se manifestent sur des îlots plus ou moins étendus de cellules fortement colorées, Si l'on emploie la coloration à la fuchsine anilinée d'Altmann, ces cellules surcolorées sont à la fois tuméfiées, volumineuses et vacuolisées. Leur teinte sombre (qui ne correspond nullement à l'état sombre de la cellule hépatique anciennement décrit) est due à l'augmentation de volume des mitochondries dont la taille devient remarquablement inégale, notamment au pourtour des vacuoles. Le cytoplasme structuré basophile se condense, ainsi que l'a brièvement noté Rathery. Cet état correspond-il encore, ainsi que se le demande ce dernier auteur, à des modifications physiologiques, ou représente-t-il déjà une lésion? toujours est-il qu'insensiblement le chondriome se désorganise et s'agglomère à mesure que le glycogène disparaît, que les graisses et les pigments s'accumulent. Cependant on peut aussi noter des cellules surchargées de graisses (Launoy) et de pigments (Garnier et Reilly) dont le chondriome est encore plus ou moins régulièrement distribué.

D'autre part lorsque l'altération s'aggrave, la cellule se rétracte sans présenter de surcharge graisseuse ni pigmentaire, mais se montre surcolorée par la diffusion dans l'ensemble de son protoplasma de sa substance mitochondriale. Dans d'autres

cas la cellule subit une sorte de tuméfaction claire : mitochondries et enclaves disparaissent en même temps.

Parallèlement à ces altérations variables du protoplosma, le noyau montre lui aussi des modifications plus discrètes, mais peut-être aussi significatives, en rapport avec le rôle primordial du noyau dans la vie normale et pathologique de la cellule. A côté des noyaux hypertrophiés, quelquefois géants ou multiples, pourvus de nucléoles en général volumineux, également multiples, il y a de véritables altérations traduites par l'aspect irrégulier, chiffonné (noyau flétri de Gilbert et Jomier) de la membrane nucléaire, avec réduction du nucléole, qui devient moins acidophile, et colorabilité du suc nucléaire acidophile. Parfois on voit des vacuoles ou des taches acidophiles dans le noyau ; ces figures préludent sans doute à la pycnose qui s'observe dans les éléments plus altérés.

Telles sont en somme les signes discrets de l'hépatite, qui ne se manifeste pas encore par des altérations dégénératives graves et étendues. Mais bien que ces premières descriptions aient paru d'emblée susceptibles de recevoir une interprétation physiologique, et que Fiessinger ait pu dire notamment que *la première réaction à l'intoxication est traduite par l'hyperactivité et l'épuisement des réserves*, leur intérêt reste limité en clinique. La technique est très délicate, d'une exécution souvent irréalisable ; elle aboutit à l'interprétation physiologique par suite de vues histologiques encore incertaines. Du reste on ne voit pas pourquoi les cellules ainsi lésées ne produisent ni pigment, ni glycogène, et ont perdu en partie leurs fonctions uréopoïétique, antitoxique, etc..., c'est-à-dire en quoi ces modifications morphologiques correspondent à des altérations chimiques et biologiques.

Il nous a paru cependant qu'une technique très simple, jointe aux précédentes, pouvait déceler des altérations chimiques importantes, sous les modifications structurales. Nous voudrions rappeler comment nous avons pu, dans une étude entreprise au cours de la guerre, signaler au cours du choc traumatique, l'insuffisance hépatique : constatation que l'abaissement du coefficient azoturique (Ch. Richet et Flament) et l'augmentation de l'azote résiduel du sang circulant (Duval et Grigaut) ont immédiatement corroborée.

IV. — Technique.

La technique que nous avons employée comporte d'abord la fixation de nombreux fragments de tissu hépatique n'ayant subi aucune altération cadavérique (prélevés au bout d'une demi-heure, par conséquent) dans l'alcool absolu, le formol osmiqué, et le bichromate de potasse-formol selon la technique de Regaud. On peut ainsi pratiquer l'étude du glycogène, des graisses, des pigments et du chondriome. On doit en outre faire une fixation soit à l'alcool absolu, soit au bichromate de potasse-formol-acide acétique, suivie de la coloration au vert de méthyle pyronine de Pappenheim, pour l'étude du cytoplasme cellulaire.

Les lésions que nous avons observées chez des hommes morts de choc traumatique après blessure (c'est-à-dire dans des conditions où l'on pourrait invoquer des causes toxiques ou inflammatoires multiples : intoxications par produits d'autolyse musculaire, chloroformisation, éthérisation, asphyxie, infection aiguë) correspondaient à une insuffisance hépatique, que l'examen du coefficient azoturique caractérisait nettement (0,70, 0,65, et même 0,53).

On peut donc les considérer comme représentant le stade de début d'une hépatite toxique ou inflammatoire plus ou moins grave, la mort étant d'ailleurs survenue du fait de causes et de lésions diverses dans les vingt-quatre ou quarante-huit heures. Chez plusieurs sujets morts d'hémorragie et qui ne présentaient pas d'abaissement marqué du coefficient azoturique, nous n'avons retrouvé ces altérations que dans de très petits îlots cellulaires.

V. — Description.

En ce qui concerne les altérations du *noyau* de la cellule hépatique, nous n'avons rien à ajouter aux descriptions des auteurs précédents.

C'est dans le *cytoplasme* que se voient les modifications les plus significatives.

Le cytoplasme. — Les mitochondries sont devenues volumineuses, marquant peut-être leur évolution vers différents

stades de grains de sécrétion, inégales et disposées autour des vacuoles ou des globules graisseux qui apparaissent. L'aspect est comparable à celui que Rathery a figuré et décrit sous le nom de premier degré de cytolyse et premier degré d'homogénéisation. Elles sont surtout volumineuses lorsque la cellule est très vacuolisée. Le cytoplasme structuré subit, outre l'hypertrophie ou la contraction signalées par divers auteurs, une désorganisation déjà visible ; au lieu de s'ordonner en réseau rayonné ou même en faisceaux séparés, comme cela se voit lorsqu'il y a de nombreux produits de sécrétion, il se condense sous forme de mottes extrêmement irrégulières, et s'épaissit par blocs et gros filaments déchiquetés, ainsi que l'ont vu Rathery, Mayer et Schoeffer. Si l'on fait une coloration élective de ce cytoplasme figuré par le bleu polychrome ou par la pyronine après fixation par l'alcool absolu surtout, mais aussi après fixation au formol-bichromate de potasse, on trouve des cellules très riches en gros corps basophiles qui ont à peu près l'aspect des corps de Nissl (1) des cellules nerveuses. Mais si le cytoplasme condense et dissocie ainsi la substance basophile, qui se comporte, lorsqu'on emploie le mélange vert de méthyle-pyronine phéniqué de Pappenheim, comme si elle était fortement réductrice, à l'égal du cytoplasme des plasmocytes, on peut constater qu'inversement le reste du protoplasma devient plus acidophile. La plupart des auteurs ont noté surtout cette acidophilie pathologique dans certaines conditions, bien que la basophilie ait été aussi parfois rencontrée (Aubertin).

D'ailleurs si l'on progresse des travées périportales vers les cellules péri-sus-hépatiques, on voit que ces masses basophiles sont d'autant moins nombreuses que le reste du protoplasme est plus acidophile, comme s'il se faisait une expulsion des masses basophiles.

Et en effet, le protoplasme devient acidophile lorsque la cellule réduit sa taille et se contracte par un mécanisme que l'on peut suivre par endroits : sa périphérie au pôle vasculaire plus riche en vacuoles et en corps basophiles, semble devenue plus fragile ; elle se déchire facilement si l'on emploie un fixateur

(1) Ils diffèrent d'ailleurs des corps de Nissl par leur colorabilité difficile par l'hématoxyline au fer; le liquide de Bouin les fixe mal.

brutal comme l'alcool absolu, et se désagrège (1) en mettant en liberté le long des capillaires sanguins, et ses corps basophiles et ses produits. On voit bientôt des amas de substance amorphe fortement colorables par l'hématoxyline, par la fuchsine et aussi par la pyronine, qui encombrent les capillaires et même les vaisseaux sus-hépatiques. Il y a donc un véritable effritement du corps protoplasmique. Cette altération, bientôt suivie de déformation et de rétraction, précède les grosses altérations nucléaires. C'est une sorte de *cytolyse à corps tigroïdes*.

La graisse est très abondante au bout de vingt-quatre heures dans la zone péri-sus-hépatique, qui est dépourvue de corps basophiles. Les pigments paraissent au contraire abondants dans la zone périportale surtout, mais ailleurs aussi ; ils présentent parfois les réactions du fer.

Le glycogène a entièrement disparu, tout au moins par les procédés de coloration usuels du glycogène. On sait qu'il disparaît à la dernière période des infections et des intoxications expérimentales (Loeper et Esmonet).

VI. — Interprétation.

En somme si l'on en juge par les enclaves, c'est-à-dire par la graisse et les pigments, qui paraissent nombreux au premier abord, on a l'impression que la cellule, très active, a fourni un certain nombre de produits d'élaboration. Notons que ces produits, cette surcharge graisseuse et pigmentaire, sont bien moins abondants que dans certains groupes cellulaires, au niveau de foyers inflammatoires, dans les plaies hépatiques par exemple, ou surtout que dans certaines circonstances, lorsque la survie est un peu plus longue ; et il semble que cette formation incomplète et hâtive ait entraîné avec le bouleversement de l'architecture protoplasmique et de ses propriétés chimiques, un véritable épuisement du chondriome (V. Fiessinger). Car ainsi que nous l'avons vu dans un foie en hypertrophie fonctionnelle, les mitochondries y conservent en

(1) Achard et Paisseau obtiennent cet aspect déchiqueté en injectant des solutions hypotoniques d'urée.

période d'hyperactivité leur petite taille et leur ordination, enfin le glycogène y est abondant.

A vrai dire ce qui nous paraît significatif dans ces faits, c'est moins l'épuisement des réserves et les altérations structurales du cytoplasme, considérées au point de vue morphologique — bien que nous nous proposions de revenir sur ce point tout à l'heure —, que ce fait important au point de vue chimique : à savoir la séparation des substances basiques et acides du protoplasma et l'expulsion de ces dernières dans les voies sanguines. Ces corps tigroïdes, basophiles, images de l'activité hépatique comme de l'activité nerveuse, se comportent comme des corps réducteurs, si l'on emploie le colorant de Pappenheim au vert de méthyle-pyronine : leur élimination ne peut que témoigner de la perte d'une des fonctions chimiques essentielles du foie qui, on le sait, se comporte comme un organe réducteur.

Ces phénomènes sont-ils dus à la disparition du glycogène, qui, d'après Roger, est le témoin obligé du pouvoir antitoxique du foie?

Ne constituent-ils pas un des signes précoces de cette autolyse que Launoy a si bien décrite d'après ses recherches expérimentales, et qui pourrait ainsi se manifester non pas seulement après la mort, mais encore dans la période agonique, au moment où la stase veineuse hépatique, défavorable à l'élimination des produits de clivage des constituants cellulaires, favorise l'action des ferments protéolytiques (Ch. Richet) et l'apparition des amino-acides (histidine, leucine, tyrosine ; Wells, cité par Launoy)? L'autolyse cadavérique étudiée par Launoy se révèle par la disparition du glycogène, la fonte des granulations fuchsinophiles, l'accentuation du réseau cytoplasmique, avec dilatation de ses mailles, toutes altérations qui seraient consécutives à l'hydrolyse du glycogène, le noyau étant du reste moins modifié que le cytoplasme.

Cependant, quelles que soient les analogies de cette autolyse avec les images que nous avons observées, nous pensons que l'asphyxie cellulaire par stase de la période agonique ne suffirait pas à les produire seule ; dans des cas de mort par anémie lente avec période agonique prolongée, nous ne les avons pas retrouvées.

Il n'est pas inutile de remarquer que l'état de fragilité de la

cellule hépatique a été bien décrit par Hanot, à propos de la dislocation de la travée hépatique; mais le mécanisme de cette dislocation gardait alors une signification toute morphologique. Nous serions tenté au contraire, considérant que la rétraction cellulaire consécutive à l'élimination des corps basophiles s'accompagne de pycnose nucléaire, d'y voir une sorte d'épuisement et de désorganisation de la cellule, un état qui n'est pas sans analogie avec celui des éléments d'une glande holocrine.

Le fait même que la cellule hépatique se régénère par multiplication des noyaux dans certaines conditions, ainsi que l'ont vu Hanot et plus récemment Launoy et Widal et Abrami, atteste qu'une partie des éléments épuisés est destinée à disparaître, et justifie cette analogie.

Conclusion.

Il est donc à retenir que l'on peut observer un état de désorganisation de la cellule hépatique consécutif à des causes inflammatoires ou toxiques diverses dans des cas où il semble correspondre à un déficit marqué de l'uréopoïèse. Cette altération implique l'atteinte d'une des propriétés essentielles de l'élément cellulaire, de celle qui a trait aux *fonctions réductrices* du foie. Le déficit de ces fonctions est très apparemment marqué par la dissociation des parties acides et basiques du protoplasma, puis par la disparition des corps basophiles ainsi formés, que les réactions tinctoriales nous permettent de considérer comme réducteurs.

BIBLIOGRAPHIE

Aubertin, Contribution à l'étude des lésions du foie d'origine chloroformique. *Arch. de Méd. exp.*, 1909, p. 443.

Chauffard et Brodin, Les variations de l'azote résiduel. Leur importance comme signe d'insuffisance hépatique. *In* Brodin, *Thèse*, Paris, 1903.

Duval et Grigaut, La rétention azotée des blessés, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 19 octobre 1918.

Fiessinger, Les canalicules biliaires intercellulaires en histologie pathologique. *Arch. de méd. exp.*, 1910, p. 34-76.

— Les altérations précoces de la cellule hépatique. *Journ. de Physiol. et Path. gén.*, janvier 1908.

— La cellule hépatique. *Thèse*, Paris, 1908.

— La cellule hépatique, *Revue générale d'histologie*, **15**, novembre 1911.

— Les lésions cellulaires dans les cirrhoses du foie. *Arch. de Méd. exp.*, 1908, p. 313.

Garnier et Reilly, Anatomie du foie dans la spirochétose. *Arch. de Méd. exp.*, mars 1919.

— Etude anatomique de l'ictère grave. *Arch. de Méd. exp.*, mars 1920, p. 565.

Gilbert et Jomier, Cellules hépatiques claires. Travées hépatiques normales. *Presse Médicale*, 1908, p. 353.

Hanot, Note sur les altérations cellulaires du foie infectieux. *C. R. Soc. de Biol.*, 1893, p. 636.

Launoy. *C. R. Soc. de Biol.*, 24 décembre 1909, p. 807.

— Autolyse aseptique du foie. Ces *Annales*, janvier, décembre 1909, p. 1, et p. 979.

Loeper et Esmonet, Le glycogène dans les infections et les intoxications. *C. R. Soc. de Biol.*, 5 décembre 1904,

Martin et Pettit. *La spirochétose ictérohémorragique*, Paris, Masson, 1919.

André Mayer, Rathery, Schoeffer, Lésions expérimentales de la cellule hépatique, *Arch. de Méd. exp.*, 1910, p. 177, 198.

Nanta, Les altérations initiales du foie dans les grands traumatismes. *C. R. Acad. des Sciences*, **166**, p. 706, séance du 29 avril 1918.

— Le glycogène hépatique au début des grands traumatismes. *C. R. Soc de Biol.*, 11 mai 1918, p. 45.

Prenant, Les mitochondries et l'ergastoplasme, *Journ. d'Anat. et de Physiol.*, 1910, p. 217, 289.

Rathery, La cellule hépatique normale. De l'état granuleux; son importance dans l'interprétation exacte des altérations anatomo-pathologiques du foie. *Arch. Méd. exp.*, janvier 1909, p. 50.

Ch. Richet et Flament, Quelques troubles de la sécrétion urinaire après les grands traumatismes. *C. R. Acad. Sciences*, mai 1918, **166**, p. 718.

Widal et Abrami, Etat grave infectieux avec rétention azotée et urémie sèche par azotémie. Hyperplasie des cellules hépatiques, *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp.*, Paris, 1908, p. 523.

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

Fig. 1. — Foie L., vingt et un ans, narcose au chloroforme, mort dix heures après. Rapport azoturique : 0,53. — Grossissement : 700. Coloration au vert de méthyle-pyronine.

Fig. 2. — Foie D., trente ans, plaie de poitrine, mort par suite d'hémorragie. Rapport azoturique : 0,84. — Grossissement : 700. Coloration au vert de méthyle-pyronine.

Fig. 3. — Foie Z., dix-neuf ans, mort dix-sept heures après plaie du foie. Bord de la plaie.

Fig. 4. — Foie L., même sujet que fig. 1. Coloration au bleu polychrome.

Fig. 5. — Foie F., vingt-huit ans, mort dix heures après laparotomie et narcose au chloroforme, avec foyer de gangrène gazeuse de la paroi abdominale. — Grossissement : 700. Coloration au vert de méthyle-pyronine.

Fig. 6. — Foie D. (*a* et *b*), cellules hépatiques normales. Foie H. (*c d e*), en dégénérescence granulo-graisseuse et vacuolaire, trente-six heures après blessure du foie (rapport azoturique : 0,53). — Grossissement : 1.000. Coloration au vert de méthyle-pyronine sur frottis par impression.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE
DU *PIROPLASMA (GONDERIA) MUTANS* DU BŒUF

(Avec la planche II).

par Edm. SERGENT.

Les parasites endoglobulaires du sang du bœuf que l'on rattache à l'espèce *Piroplasma* (*Gonderia*) *mutans*, Theiler 1905-1906 ont donné lieu à des descriptions très disparates.

Il a paru nécessaire, avant d'aborder l'étude expérimentale de ces parasites, d'en préciser les types morphologiques et de tâcher d'en déterminer les stades évolutifs.

On a donc examiné plus d'un millier de petits Piroplasmes (1369), dont chacun était dessiné et mesuré. On notait en même temps la proportion de globules rouges parasités.

Le sang provenait de 6 bovins algériens de quinze mois à trois ans dont 3 en bon état de santé, et 3 atteints de différentes affections sans rapport apparent avec l'infection à *mutans* (1 jaunisse, 2 péritonites purulentes). Ils ne montraient aucune autre forme parasitaire que des petits Piroplasmes répondant à la définition classique actuelle de *P. mutans* :

Caractères spécifiques de P. mutans : anneaux et bâtonnets ne se distinguant pas morphologiquement de *Theileria parva. P. mutans* se différencie de *T. parva* par : l'absence des corpuscules de Koch dans les ganglions et la rate, le petit nombre des parasites présents dans le sang périphérique, l'altération des lobules rouges, la non-pathogénéité apparente et l'inoculabilité (Theiler [**32**], Gonder [**16**]) (1).

Bettencourt, França et Borges [**2**] font rentrer le *P. mutans* dans le genre *Theileria* (1907) ainsi défini : « Petits parasites bacilliformes qui, en se divisant, donnent des formes en croix. »

(1) L'espèce décrite en 1904 en Transcaucasie sous le nom de *P. annulatum* par Dschunkowsky et Luhs [**10**] ne peut pas être conservée. Certains caractères appartiennent à *Th. parva* (forte proportion des hématies parasitées, absence de lésions des hématies). Par tous les autres caractères, *P. annulatum* s'identifie avec *P. mutans*, y compris l'inoculabilité, qui n'avait pas été signalée dans le premier mémoire de Dschunkowsky et Luhs, mais dont la réalité a été reconnue dans les recherches ultérieures.

Du Toit (34) crée, en 1918, pour *P. mutans*, un genre nouveau : *Gonderia* : « Petits parasites ronds ou bacilliformes. Multiplication par division en quatre éléments composés presque uniquement de chromatine et disposés en forme de croix ».

D'après du Toit, le genre *Gonderia* se distinguerait du genre *Babesia* (*Piroplasma*) par l'absence de formes en poire, par l'existence de la quadripartition, par l'absence de la bipartition.

Il se distinguerait du genre *Theileria* par l'absence de l'évolution schizogonique spéciale à ce genre (corpuscules de Koch).

Il se distinguerait du genre *Nuttallia* par l'existence d'éléments bacilliformes et l'absence d'éléments piriformes.

Nous verrons que s'il est possible de séparer *mutans* du genre *Theileria* à cause de l'absence de l'évolution schizogonique particulière à ce dernier genre, la définition de du Toit du nouveau genre *Gonderia* doit être revisée. Le *P. mutans*, en effet, montre des formes en poire, et possède, en plus de son mode de division en quatre, un mode de division binaire.

Les formes parasitaires étudiées peuvent être classées en trois grands groupes (planche II) :

I. — Eléments ronds, ovalaires ou elliptiques, aboutissant à des formes de division. Présence constante d'une grosse vacuole unique.

II. — Eléments bacilliformes sans vacuole, à noyau long occupant la moitié de la longueur du corps. Division binaire fréquente.

III. — Eléments bacilliformes ayant les caractères de gamètes.

I. — Formes rondes, ovalaires ou elliptiques, à grosse vacuole unique.

[IA] Les plus petites formes visibles, dont le diamètre est inférieur à 1/3 de μ, sont rondes. On voit un anneau, fait mi-partie de rouge chromatine, mi-partie de bleu cytoplasme, entourant une vacuole centrale. On classe parmi ces jeunes formes annulaires toutes celles dont le diamètre est inférieur à I μ.

[IAA] On retrouve les mêmes formes annulaires, de semblable aspect, avec des dimensions croissantes, atteignant 2 μ de diamètre. La longueur moyenne du diamètre est de I μ 6.

[IB] A côté des anneaux, on voit des éléments de même struc-

ture, mais dont la forme, au lieu d'être circulaire, est ovalaire ou elliptique. Dimensions moyennes 2 μ 4 × 0 μ 8. Longueur maxima 3 μ 5, minima I μ. Largeur maxima I μ, minima 0 μ 4. Le noyau et le cytoplasme, au lieu de former deux demi-cercles, dessinent deux fers à cheval se touchant par leurs extrémités. Dans les ellipses, la chromatine dessine parfois, au lieu d'un fer à cheval, la forme d'un croissant (voir la figure). Une de ces ellipses à noyau en croissant était extraglobulaire. Le cytoplasme des formes ovalaires est parfois tordu comme une flamme sous le vent, ce qui fait supposer l'existence de mouvements flagelliformes.

Les ovales et les ellipses correspondent peut-être à des anneaux déformés par des compressions ou par des conditions spéciales d'équilibre.

[IAX] [IBX] Le développement, soit des anneaux, soit des ovales ou ellipses, aboutit à des formes de division. Le demi-cercle ou la demi-ellipse de chromatine présente deux, trois ou quatre renflements punctiformes entre lesquels des ponts de chromatine lâche subsistent longtemps.

[IC] Le terme ultime est constitué par des groupes de quatre grains chromatiques (rarement trois) colorés en rouge foncé, disposés en un losange de 1 μ 5 de diagonale en moyenne, sans trace de cytoplasme, mais souvent avec des restes de chromatine lâche rose pâle. Ces filaments rose pâle réunissent parfois les grains rouges deux par deux et ainsi figurent deux haltères parallèles. Parfois ils les unissent tous les quatre, en dessinant les côtés d'un quadrilatère irrégulier. Les filaments roses ne sont jamais disposés en diagonale dans les groupes quaternaires. Les quatre grains sont de forme irrégulièrement ovalaire, anguleuse ; ils ne sont presque jamais situés tous les quatre sur le même plan.

Deux fois seulement on a vu une forme en croix (bras de la croix formés de cytoplasme bleu, extrémités marquées par des grains rouges). Dans le premier cas, forme cruciale régulière, quatre gros grains chromatiques, plus un cinquième petit grain sur un bras de la croix. Dans le deuxième cas, les travées bleues dessinent un L. Il y a trois grains chromatiques occupant les extrémités et le sommet de l'angle. Un quatrième petit grain ponctue le milieu de la petite branche bleue.

II. — Eléments bacilliformes à noyau long.

[II] Les éléments les plus jeunes sont des petits bâtonnets de chromatine de moins de 1 μ de longueur. On voit surtout des bacilliformes de 2 μ 4 de longueur en moyenne sur 0 μ 2 ou 0 μ 3 d'épaisseur. Longueur maxima 4 μ, minima 1 μ 3. Largeur maxima 0 μ 6, minima 0 μ 2. La largeur est à peu près égale sur toute la longueur. Les extrémités sont en général arrondies ou légèrement effilées. Parfois l'une d'elles est rectangulaire, ce qui donne au parasite un aspect cunéiforme.

Contrairement à la majorité des descriptions des bacilliformes données jusqu'ici, le noyau n'est pas rond, mais est allongé en baguette linéaire occupant la moitié environ de la longueur du parasite, qui a par suite l'aspect d'un bâtonnet mi-rouge, mi-bleu.

Dans le tiers des cas (190 fois sur 559 parasites) le noyau long est marqué à ses extrémités par deux points plus rouges, ce qui le rend semblable à une haltère. Ce sont les formes II BI et II B2. (190 parasites sur 1.369, soit 13,88 p. 100 du nombre total des parasites).

Enfin, dans le tiers des cas également (203 fois sur 559), les bacilliformes à noyau linéaire (que celui-ci soit compact ou à deux granulations) présentent des mouvements flagelliformes (aspect d'arc, de flamme de bougie, de baïonnette). Ce sont les formes II A2 et II B2, (203 parasites sur 1.369, soit 14,83 p. 100 du nombre total des parasites).

III. — Eléments bacilliformes à caractères de gamètes.

[III] Des éléments, qui semblent dériver de ces bacilliformes, présentent enfin les caractères des gamètes : microgamètes [III *m*] à gros noyau alvéolaire ou vacuolaire, à cytoplasme clair, lâche, vacuolaire. Les plus petits à noyau rond, forme très fréquemment signalée par les auteurs, n'ont été que très rarement rencontrés dans nos observations. Dimensions moyennes 2 μ 3 × 0 μ 5. Longueur maxima 2 μ 8, minima 1 μ. Largeur maxima 0 μ 6, minima 0 μ 3.

Macrogamètes [III *f*] à noyau lâche et peu abondant, à cyto-

Tableau résumé des 1.369 parasites étudiés.

Formes annulaires, ovalaires ou elliptiques	649 (**47,4** 0/0)	Annulaires	IA	368	**26,8** 0/0	I A.	Jeunes annulaires < 1 μ.	241	**17,6** 0/0
						I AA.	Annulaires adultes > 1 μ.	110	**8,03**
						I AX.	Les mêmes en division.	17	**1,24**
		Ovalaires ou elliptiques	IB	272	**19,8** 0/0	IB.	Adultes	249	**18,18**
						IBX.	Les mêmes en division.	23	**1,68**
		Groupe quaternaire de mérozoïtes						9	**0,65**
Bacilliformes à noyau long.	559 (**40,83** 0/0)	Noyau compact	II A	369	**26,9** 0/0	I A1.	Rectiligne	237	**17,31**
						II A2.	Tordu	132	**9,64**
		Noyau en division binaire	II B	190	**13,88** 0/0	II B1.	Rectiligne	119	**8,69**
						II B2.	Tordu	71	**5,18**
Gamètes	161 (**11,83** 0/0)	III M. Microgamète						141	**10,29**
		III F. Microgamète						20	**1,46**

plasme compact, bleu profond. Dimensions moyennes $2\mu 5 \times 0\mu 9$. Longueur maxima $3\mu 3$, minima 2μ. Largeur maxima $1\mu 3$, minima $0\mu 3$.

* * *

Les mêmes types de parasites ont été retrouvés chez les six bovins examinés, mais la proportion relative des différents types varie d'un bovin à un autre.

On verra dans le tableau ci-dessous que chez deux bovins il y a forte prédominance des éléments annulaires, ovalaires ou elliptiques, au détriment des bacilliformes, et que c'est l'inverse chez les quatre autres bovins.

	BOVINS 0 ET 1 — Sur 559 parasites	BOVINS 12, 15, 16, 19 — Sur 810 parasites
Formes annulaires, ovalaires ou elliptiques	447 = 79,96 p. 100	202 = 24,93 p. 100
Bacilliformes.	52 = 9,3 —	507 = 62,59 —
Gamètes	60 = 10,73 —	101 = 12,46 —

Dans les cas observés, on ne peut pas expliquer la prédominance de telle ou telle forme, à un moment donné, par l'âge de l'animal, ni par la présence ou l'absence d'un état morbide quelconque, ni par la saison. Les variations de la formule parasitaire n'ont aucune relation avec la courbe de la température interne de l'animal.

Interprétation des formes observées.

I. — Les formes rondes, ovalaires ou elliptiques, possédant une grosse vacuole unique dès leur plus jeune âge [I], nous semblent représenter les formes schizogoniques habituelles de *P. mutans*. On peut suivre tous les stades de l'évolution du noyau étiré en demi-cercle ou en fer à cheval, aboutissant à la division en quatre grains irréguliers de chromatine, plus rarement en deux ou trois [de IA à IC].

II. — Les éléments bacilliformes à mouvements flagelli-

formes, à noyau allongé en baguette [II] sont des éléments jeunes qui sont susceptibles de présenter une division binaire analogue à celle que l'on observe parfois chez les jeunes *Plasmodium* du paludisme, assurant ainsi aux parasites, dans certains cas dont le déterminisme n'est pas établi, un second mode de reproduction asexuée.

III. — Les autres éléments bacilliformes [III] aboutissent à la formation de gamètes.

Formes d'anaplasmes.

Sur les 229.800 globules rouges examinés, on a vu, en plus des 1.369 petits Piroplasmes, 15 figures répondant à la définition des Anaplasmes, et également à celle des corps de Jolly.

Leur diamètre moyen est de 0 μ 9. Le plus grand a 1 μ 3, le plus petit 0 μ 25.

Leur présence chez les animaux observés n'est pas en rapport avec un état pathologique ou anormal quelconque.

Ils ressemblent beaucoup aux grains chromatiques des groupes quaternaires décrits plus haut [IC]. Il y a une différence de forme : la forme d'anaplasme est bien arrondie, tandis que la granulation qui résulte de la division de la chromatine est encore, avant l'éparpillement du groupe, anguleuse et irrégulière (1).

Examen des hématies.

Pour 229.800 globules rouges examinés, on a trouvé 1.369 parasites, ce qui représente une moyenne de 5,9 parasites pour 1.000 globules rouges.

Le maximum n'a pas dépassé vingt parasites pour 1.000 globules rouges. Cette proportion de 20 p. 1.000 a été observée chez une génisse atteinte de péritonite purulente. Mais on a également vu l'infection d'une génisse en très bonne santé, qui

(1) La concomitance de petits Piroplasmes et des formes d'anaplasmes est souvent signalée (Laveran [**18**], Theiler [**32**], Balfour [**1**], Sergent [**27**] etc.). Tandis que Theiler fait d'*Anaplasma marginale* un parasite spécial, Dschunkowsky et Luhs [**10**] le rattachent à *Theileria annulata*, parasite de leur « piroplasmose tropicale ». Il caractériserait les formes chroniques de la maladie. De même Ducloux [**11**], Carpano [**7**]. Ollwig et Manteufel décrivent même la transformation des granulations punctiformes en bâtonnets [**24**].

se maintenait à 2 p. 1.000 en moyenne pendant plus d'un an, monter, à un certain moment, sans cause apparente, à 16 p. 1.000, pour revenir ensuite à son premier taux.

BOVINS	0	1	12	15	16	19	TOTAL
Nombre d'hématies examinées.	18.000	69.800	90.300	12.000	2.000	36.900	**229.800**
Proportion d'hématies infectées, sur 1.000. .	5,3	6,5	0,2	2	6	15,2	**5,9**

On a dû parfois examiner plus de 20.000 globules rouges pour trouver un parasite.

La lésion sanguine la plus marquée est l'anisocytose. On voit parfois des hématies pointillées.

Les hématies parasitées ne présentent pas d'altérations particulières : les unes sont plus petites, les autres plus grandes qu'une hématie moyenne.

Diamètre moyen : 4µ9.

Diamètre minimum : 4µ.

Diamètre maximum : 6µ5.

Sur 1.369 parasites, un seul était extraglobulaire (une grande forme elliptique).

Il y eut 12 fois infection double d'un globule rouge : 8 fois les deux parasites étaient tous deux de forme annulaire ou ovale, 4 fois ils étaient tous deux bacilliformes.

Examen microscopique des ganglions.

Le suc ganglionnaire examiné à la suite de biopsies ou à l'autopsie, ainsi que, dans ce dernier cas, le suc splénique, n'ont jamais montré les corps granuleux de Koch, qui caractérisent *Th. parva*.

CONCLUSIONS

L'étude détaillée de 1.369 petits Piroplasmes répondant aux caractères du *Piroplasma* (*Gonderia*) *mutans*, chez 6 bovins algériens quelconques (3 en bonne santé, 3 atteints de diffé-

rentes infections), a permis de constater que le *mutans*, parasite toléré, présente deux types morphologiques principaux dont la proportion numérique est fort variable, qu'il possède deux modes de reproduction schizogonique et des gamètes dans le sang périphérique.

I. — Parasitisme faible dans les cas observés : sur 1.000 globules rouges, 5,9 en moyenne sont infectés. Maximum : 20 pour 1.000. L'infection par le *mutans* est compatible avec le maintien d'un excellent état de santé.

II. — Le *mutans* se présente sous deux formes principales : la première est annulaire avec une grosse vacuole, la seconde est bacilliforme. Ces deux types avec toutes leurs variétés ont été retrouvés chez les 6 bovins examinés, mais dans des proportions fort différentes. Chez 2 animaux ce sont les formes circulaires qui dominent (80 p. 100), chez les 4 autres elles sont moins nombreuses (25 p. 100) que les bacilliformes.

III. — Chacune de ces formes présente des figures de reproduction schizogonique. De plus, aux bacilliformes se rattachent des figures de gamètes :

1° Les formes rondes, ovalaires ou elliptiques, à grosse vacuole unique, aboutissent à une division quaternaire (parfois ternaire?) : 649 formes sur 1.369 parasites (soit 47,4 p. 100);

2° Les jeunes éléments bacilliformes, à noyau étiré en baguette occupant la moitié de la longueur du corps, montrent, dans un tiers des cas, une division binaire : 559 formes (40,8 p. 100);

3° Les éléments sexués sont de gros éléments bacilliformes à noyaux ronds ou ovalaires, avec les caractères des gamètes : 161 formes (11,8 p. 100).

A tous les stades les parasites se montrent doués de mouvements flagelliformes (1).

(1) La définition du genre *Gonderia* du Toit 1918, dont le type est *mutans*, doit être corrigée ainsi qu'il suit :

« Petits parasites annulaires, ovales ou elliptiques ou bien bacilliformes. Multiplication dans le sang périphérique par division quaternaire des éléments annulaires ou par division binaire des bacilliformes. »

BIBLIOGRAPHIE

[1] A. Balfour, Piroplasmosis in the anglo-egyptian Sudan. *Third Report of Wellcome Research Laboratories. Gordon mem. Coll. Khartoum*, 1908, p. 37.

[2] A. Bettencourt, C. Franca et I. Borges, Un cas de Piroplasmose bacilliforme chez le Daim. *Archivos do Real Instituto Bacteriologico Camara Pestana*, 1er janvier 1907, 7, p. 341, 349.

[3] Bettencourt et I. Borges, Sur une *Theileria* parasite du *Cephalophus grimmi* (L.). *Institut royal de bactériologie Camara Pestana*, 1909, **3**, p. 19.

[4] G. Bouet, Piroplasmose bovine observée à la Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Path. exot*, 1908, **1**, p. 234, 236.

[5] A. Broden et J. Rodhain, Piroplasmoses des bovidés observées au Stanley-Pool. *Bull. Soc. Path. exot*, 1909, **2**, p. 120, 124.

[6] Carpano, Su di un piroplasma tipo « parvum » (genere *Theileria*) riscontrato nella gazzella in Eritrea. *Clinica Veterinaria*, 1913.

[7] —, Piroplasmosi tipo « parvum » nei bovini del basso bacino del mediterraneo. Febbre della costa mediterranea. *Clinica Veterinaria*, 1915.

[8] Denier, Sur un Piroplasme du *Cervus aristotelis* de l'Annam. Ces *Annales*, 1907, **21**, p. 657.

[9] W. Dreyer, Ueber durch Protozoen im Blut hervorgerufene Erkränkungen bei Menschen und Tieren in Ægypten. *Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene*, 1910, **14**, p. 37, 45.

[10] E. Dschunkowsky et J. Luhs, Die Piroplasmosen der Rinder. *Centr. für Bakt. und Parasit. Or.*, 1904, **35**, p. 486, 492.

[11] E. Ducloux, Sur une piroplasmose bacilliforme du bœuf en Tunisie. *C. R. Soc. Biol.*, 1905, **57**, p. 461, 463.

[12] C. França, Sur la classification des Piroplasmes et description de deux formes de ces parasites. *Institut royal de bactériologie Camara Pestana*, 1909, **3**, p. 11, 18.

[13] —, Quelques considérations sur le genre *Theileria* et description d'une nouvelle espèce de ce genre (*Theileria stordii*). *Centr. für Bakt., Parasit. und Infektionskr. Or.*, 1912, **67**, p. 171, 175.

[14] —, Sur un Piroplasmide des bovidés de la Côte d'Or (*Achromaticus macfiei n. sp.*). *Anals Scientificos da Faculdade de Medicina do Porto*, 1918, **4**, p. 5, 12.

[15] R. Gonder, The development of *Theileria parva*, the cause of east coast fever of cattle in South Africa. *Report of the Government Veterinary Bacteriologist. Transvaal*, 1909-1910, p. 69 et 1911, p. 223. *Archiv für Protistenk.*, 1910, **21** et 1911, **22**.

[16] —, *Theileria parva* und *Babesia mutans*, Küstenfieberparasit und Pseudoküstenfieberparasit (Vergleichende Studie). *Archiv für Protistenk.*, 1911, **21**, p. 222, 231.

[17] R. Koch. *Reiseberichte über Rinderpest*, etc. Berlin, 1898, p. 74. Voir aussi *Gesammelte Werke*, 1912, **2**, 1re partie, p. 482, 490, pl. XXXVI; **2**, 2e partie, p. 727, 748, 799.

[18] A. Laveran, Sur la piroplasmose bovine bacilliforme. *C. R. Acad. des Sciences*, 16 mars 1903, **136**, p. 648.

[19] G. Lichtenfeld, Beiträge zur Diagnose der durch kleine Piroplasmen

verursachten Krankheiten beim Rinde, mit Berücksichtigung ihrer Verbreitung. *Zeitsch. für Hygiene und Infektionskr.*, 1910, **65**, p. 378, 388.

[20] Martini, Ueber ein Rinderpiroplasma der Provinz Schantung (China). *Archiv für Schiffs- und Tropen hygiene*, 1907, **11**, p. 507, 511.

[21] —, Ueber das Vorkommen eines Rinderpiroplasmas in der Provinz Petschili (China). *Archiv. für Schiffs- und Tropen hygiene*, 1907, **11**, p. 718, 719.

[22] F. Martoglio, V. Stella et M. Carpano, Contributo alla conoscenza e alla classificazione dei Piroplasmi. *Ann. d'Igiene sperim.*, 1911, **21**, p. 399, 452.

[23] Miyajima et Shibayama, Ueber das in Japan beobachtete Rinderpiroplasma. *Zeitschr. für Hygiene*, 1906, **54**.

[24] H. Ollwig et Manteufel, *Babesia mutans* in Deutsch-Ostafrika und Beobachtungen zur mikroskopischen Differentialdiagnose dieses Parasiten. *Archiv für Schiffs- und Tropen hygiene*, 1910, **14**, p. 765, 769.

[25] —, *Theileriosis annulata. Theileriosis mutans. Handbuch path. Protoz.* 1912, **5**, p. 560, 562.

[26] H. Schein, Hématozoaires des bovidés en Indochine. Ces *Annales*, 1907, **21**, p. 659.

[27] Edm. Sergent, M. Béguet, A. Lhéritier et A. Boquet, Etudes sur les piroplasmoses d'Algérie, II, III, IV, V. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1913, **6** et 1914, **7**.

[28] Edm. Sergent et A. Lhéritier, Fièvre bilieuse hémoglobinurique du bœuf d'Algérie, maladie distincte des piroplasmoses. *Bull. Soc. Path. exot.*, février 1919, **12**, p. 108, 120.

[29] Springefeldt. Ueber Rindermalaria. *Malaria*, 1909, **1**, p. 139, 145.

[30] H. Soulie et G. Roig, Sur une piroplasmose bacilliforme observée sur les bovins des environs d'Alger. *C. R. Acad. des Sciences*, 20 janvier 1908.

[31] —, Piroplasmose bovine des environs d'Alger. *C. R. Acad. des Sciences*, 5 avril 1909.

[32] A. Theiler, *Piroplasma mutans n. sp.*, and the disease caused by it. *Report of the Govern. Veterinary Bacteriologist.* Transvaal, Depart. of Agric., 1905, 1906, 12 novembre 1906, p. 3 et suiv.; p. 33, 47 et suiv.; p. 66; 1908-1909, p. 37 et suiv.

[33] J. L. Todd et S. B. Wolbach, Parasitic Protozoa from the Gambia. *Journ. of Med. Research*, juin 1912, **26**, p. 195, 218.

[34] P.-J. du Toit, Zur Systematik der Piroplasmen. *Archiv f. Protist.*, 10 août 1918, **39**, p. 84, 104.

[35] H. Velu et A. Eyraud, Observations sur diverses formes de piroplasmoses, rencontrées sur des bovins indigènes de la Chaouia. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1915, **8**, p. 643, 646.

[36] J. Walker, The diagnosis of bacillary piroplasmosis of Bovines in the Transvaal. *The Veterinary Bacteriological Laboratories of the Transvaal*, 1909, p. 55, 64.

[37] W. L. Yakimoff et Nina Kohl-Yakimoff, Piroplasmose des zébus et de leurs produits de croisement en Tunisie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1911, **4**, p. 451, 452.

ESSAIS DE TRAITEMENT DU DEBAB, TRYPANOSOMIASE DES DROMADAIRES

I. AFRIDOL — II. TRYPANOBLEU — III. ÉMÉTIQUE ET ATOXYL

par Edm. et Ét. SERGENT et H. FOLEY.

I. Afridol Cl. — Couleur de benzidine recommandée par M. Nicolle et F. Mesnil (1). « O. Dichlorobenzidine + Acide H » (en abrégé Cl).

1° Chamelle Margot : infection expérimentale par le Debab. Quelques jours après l'inoculation, trypanosomes nombreux dans le sang. Affaiblissement et amaigrissement rapides. La chamelle reste couchée, incapable de se lever.

Au cours de la troisième semaine, première injection sous-cutanée de 3 grammes d'afridol.

Deuxième injection 15 jours plus tard (4 grammes).
Troisième injection 1 mois plus tard (3 grammes).
Quatrième injection 15 jours plus tard (3 grammes).
Cinquième injection 1 mois plus tard (2 grammes).

Au total 15 grammes d'afridol injectés en 4 mois.

Les trypanosomes ne disparaissent pas pour longtemps après les injections, mais l'état général se rétablit fort vite. Au bout de quatre mois, la guérison clinique est parfaite. Après deux-trois ans, le sang cesse d'être infectant.

A la suite de cette forte infection guérie par l'afridol, la chamelle a acquis une immunité solide contre le Debab (réinoculée plusieurs fois très sévèrement, elle ne se réinfecte plus, comme le démontre l'inoculation de grandes quantités de sang à des chiens).

2° Dromadaire 01 inoculé le 27 novembre 1912. Trypano-

(1) Ces *Annales*, **20**, juillet 1906, p. 513. Voir Laveran et Mesnil. *Trypanosomes et trypanosomiases*, 2e édit., 1912, Masson, p. 193.

somes nombreux pendant 1 mois. Au bout d'un mois, on commence les injections d'afridol (14 gr. 30 en 5 injections dans l'intervalle de 5 mois). Pas d'effet sur le nombre des trypanosomes, ni sur l'état général. Mort le 13 juillet 1913 avec des parasites dans le sang.

II. Trypanobleu. — Recommandé par M. Nicolle et Mesnil (1), composé « O. tolidine + acide H » (en abrégé A).

1° Dromadaire 16, infection naturelle.

Le trypanobleu à la dose de 4 grammes par jour, 3 fois de suite à 2 jours d'intervalle, ne fait pas disparaître les trypanosomes pendant plus de 4 jours.

2° Dromadaire 17, infection naturelle.

Premier essai : 3 injections de 4 grammes à 2 jours d'intervalle ne font pas disparaître les trypanosomes pendant plus de 3 jours.

Deuxième essai : 1 mois 1/2 plus tard. Même technique : 3 injections de 4 grammes à 2 jours d'intervalle sont impuissantes à faire disparaître les trypanosomes pendant plus de quelques jours. L'animal meurt dans le même mois ayant toujours montré des parasites nombreux dans le sang.

3° Chez un dromadaire pesant environ 350 kilogrammes, infecté expérimentalement depuis 2 mois 1/2, le trypanobleu s'est montré toxique à la dose de 7 grammes (mort dans les vingt-quatre heures).

III. Émétique et Atoxyl. — 1° Dromadaire A. Infecté expérimentalement le 28 avril 1914. Trypanosomes nombreux et fréquents en mai. Le 8 juin on commence une série de traitement mixte : pendant trois semaines, chaque semaine injection intraveineuse de 2 grammes d'émétique; 3 jours après, injection sous-cutanée de 3 grammes d'atoxyl. Dès la première injection, les trypanosomes disparaissent. Le dromadaire est cliniquement guéri quand la guerre oblige de le vendre en août 1914.

2° Dromadaire B. Histoire calquée sur celle du précédent.

(1) *Loc. cit.*

Ces deux dromadaires vivaient sur des pâturages sahariens dans des conditions naturelles. Ils étaient examinés 2 fois par semaine.

Conclusion. — Aux doses employées, l'afridol Cl. a déterminé la guérison 1 fois sur 2; le trypanobleu a été insuffisant; l'association émétique-atoxyl s'est montrée active.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

ESSAIS DE TRAITEMENT DU DEBAB, TRYPANOSOMIASE DES DROMADAIRES

IV. ÉTUDE DE L'ACTION DE L'ÉMÉTIQUE

par Edm. et Ét. SERGENT, A. DONATIEN et A. LHÉRITIER.

En raison des bons résultats des expériences d'orientation de 1914 sur l'emploi de l'émétique contre le debab, des essais systématiques de ce médicament sont institués.

On commence par vérifier la pureté de l'émétique (absence d'arsenic). Pour l'emploi, on met l'émétique en solution au 1/200 dans de l'eau distillée tiède, et on l'injecte lentement dans la jugulaire du dromadaire, très grosse et facile à ponctionner.

I. — Action d'une dose isolée.

Recherches préliminaires sur sept dromadaires.

Toxicité. — Les doses supérieures à 1 gr. 50 sont susceptibles de tuer un dromadaire de 300 kilogrammes en moins de vingt-quatre heures.

La dose de 1 gr. 50 et les doses inférieures sont bien supportées.

Activité. — La dose de 0 gr. 50 est insuffisante.

La dose de 1 gramme fait disparaître les trypanosomes du sang et baisser la température pendant huit jours, la dose de 1 gr. 50 pendant 10 jours.

Conclusion. — La dose à adopter est celle de 1 gramme.

II. — Action des doses répetées.

Plan de l'expérience. — Puisque les trypanosomes reparaissent huit jours en moyenne après une injection de un gramme, faire une deuxième injection huit jours après la première.

Pratiquer ainsi une série de quatre injections à une semaine d'intervalle. Puis repos.

Chaque fois que les trypanosomes réapparaîtront dans le sang périphérique, recommencer une série semblable de quatre injections de 1 gramme à huit jours d'intervalle.

Le premier essai porte sur neuf dromadaires infectés expérimentalement au laboratoire, leur sang est examiné et leur température est prise tous les jours.

Après un ou deux mois d'infection aiguë, avec fièvre et présence très fréquente de trypanosomes dans le sang (quinze jours sur trente en moyenne), on commence à faire, à six dromadaires, une première série de quatre injections. On garde comme témoins trois dromadaires.

Témoins. — D 7 montre encore des trypanosomes au dix-huitième mois.
D 8 montre encore des trypanosomes au vingtième mois.
D 11 meurt de trypanosomiase au quinzième mois.

Dromadaires traités. — *Résultats après vingt mois d'observation* : *4 succès et 2 insuccès.*

4 succès : Guérisons cliniques. — Trypanosomes définitivement disparus à l'examen microscopique du sang périphérique.

Après 4 séries de traitement,	en neuf mois	(17	grammes	d'émétique)	D 2.
Après 5	—	—	(20	—	—	) D 5.
Après 6	—	en dix mois	(24	—	—	) D 3.
Après 7	—	en onze mois	(28	—	—	) D 9 (1)

Les succès ont été obtenus par l'injection intraveineuse d'une quantité d'émétique qui a été en moyenne de 22 grammes (en cinq séries) durant l'espace de dix mois. La dose moyenne de 2 gr. 20 d'émétique par mois, répétée pendant dix mois, n'est donc pas toxique, et peut être efficace.

2 *insuccès.* — Trypanosomes persistant à l'examen microscopique du sang périphérique.

1° Après 10 séries de traitement en douze mois (39 gr. d'émétique) D 6. Trypanosomes reparus vingt-deux jours après la dernière injection et reparaissant, comme chez les témoins, jusqu'à la mort de l'animal survenue le quatorzième mois et attribuable en partie à l'intoxication par l'émétique.

2° Après 10 séries de traitement en douze mois (38 gr. d'émétique) D 1. Trypanosomes reparus vingt jours après la dernière injection et reparaissant depuis lors comme chez les témoins.

(1) Une petite rechute de deux jours, guérie sans traitement, le 18 mai 1920. (dix-huitième mois).

La dose de 3 gr. 20 d'émétique par mois répétée pendant douze mois est donc toxique et dépourvue d'efficacité.

Histoire pendant vingt mois des dromadaires inoculés le 6 Novembre 1918.

GUÉRIS	INTERVALLE entre l'inoculation et le début du traitement	JOURS à trypanosomes avant le traitement	NOMBRE de rechutes pendant le traitement	JOURS à trypanosomes après la cessation du traitement
D. 2.	50 jours.	33	4	0
D. 3.	63 —	39	5	0
D. 5.	63 —	41	4	0
D. 9.	63 —	40	7	0
INTOXIQUÉS par l'émétique non guéris				
D. 6.	31 jours.	23	13	11 jours, *mort.*
D. 1.	43 —	36	9	23 jours.
TÉMOINS		JOURS A TRYPANOSOMES		
		avant le 60° jour	à partir du 60e jour	
D. 7.	Non examiné pendant 33 j. (gestation).	26 jours sur 27	75 jours.	
D. 8.	—	39 jours.	50 jours.	

On peut remarquer que dans les quatre cas d'infection expérimentale où l'émétique a guéri les dromadaires, le traitement a été commencé un peu plus tard que dans les deux cas où l'émétique a été inefficace. Peut-être se crée-t-il plus facilement des races de trypanosomes émético-résistantes quand la médication est précoce (voir le tableau suivant).

Le résultat le plus net du traitement des chamelles est la mise bas de produits normaux.

Le signe le plus frappant du debab, chez les chamelles, est l'avortement constant au cours de la période aiguë de l'infection. Le symptôme le plus visible de la guérison des chamelles

Durée (en jours) de l'absence des trypanosomes du sang, après chaque série de quatre injections d'émétique.

CHEZ LES GUÉRIS				
APRÈS LA	D. 2	D. 3	D. 5	D. 9
1re série	11 jours.	16 jours.	12 jours.	30 jours.
2e —	25 —	24 —	39 —	24 —
3e —	40 —	12 —	13 —	14 —
4e —	92 —	24 —	87 —	63 —
5e —	∞	93 —	∞	27 —
6e —	. . . . . .	∞	. . . . . .	21 —
7e —	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	159 —
8e —	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	∞

CHEZ LES NON GUÉRIS (INTOXIQUÉS)		
APRÈS LA	D. 6	D. 1
1re série	7 jours.	10 jours.
2e —	10 —	10 —
3e —	16 —	13 —
4e —	11 —	13 —
5e —	20 —	19 —
6e —	13 —	13 —
7e —	15 —	17 —
8e —	23 —	23 —
9e —	15 —	32 —
10e —	15 —	21 —
11e —	22 — Mort.	

traitées par l'émétique a été l'heureuse terminaison de leur gestation.

Avant le traitement. — En 1919, trois chamelles pleines, infectées expérimentalement (deux depuis un mois, une depuis deux mois) mettent bas à terme des chamelons mort-nés. Il faut ajouter à ce groupe une chamelle ayant une infection naturelle passée à l'état chronique et qui met bas un chamelon non viable, qui succombe le quatrième jour.

Après le traitement. — En 1920, il y a deux mises bas, chez D 3 et D 9, chamelles infectées expérimentalement depuis quinze mois et traitées toutes deux avec succès (en ce qui concerne la disparition des trypanosomes) depuis treize mois. Les deux

chamelons naissent bien portants et vivent bien. Celui de la chamelle 3, qui est la mieux guérie, est plus développé que celui de la chamelle 9.

En résumé. — Sur trois dromadaires non traités, témoins, un meurt au quinzième mois, deux continuent à montrer des trypanosomes aux dix-huitième et vingtième mois de leur infection expérimentale.

Sur six dromadaires traités par l'émétique :

Quatre sont guéris ;

Deux sont intoxiqués par le médicament (un meurt, l'autre montre encore des trypanosomes).

Les dromadaires chez qui l'émétique a le mieux réussi sont ceux qui en ont le moins reçu. Dès que l'on arrive à l'intoxication de l'organisme, l'action parasiticide du médicament est annihilée. Il s'agit donc de trouver la dose d'émétique toxique pour le trypanosome, et non encore toxique pour le dromadaire.

Chez quatre dromadaires sur six, cette dose favorable a été comprise entre 17 et 28 grammes absorbés en neuf ou dix mois, soit 2 gr. 20 par mois en moyenne.

Chez les deux autres dromadaires, cette dose n'était pas suffisamment toxique pour le trypanosome, et lorsque l'on a voulu la forcer (38-39 grammes en douze mois, soit 3 gr. 20 par mois), elle est devenue toxique pour le dromadaire.

Par conséquent l'émétique, médicament avantageux en raison de son bas prix et de la commodité de son emploi en injection intraveineuse chez le dromadaire, est susceptible de rendre de grands services dans le traitement du debab; mais aux doses non toxiques pour le dromadaire il est quelquefois sans action sur le trypanosome.

Il y a donc lieu d'expérimenter dans ces derniers cas l'association à l'émétique d'un autre médicament.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

MICROFILAIRES DU CHIEN DANS LE SUD-ORANAIS

(*Mf. IMMITIS ; Mf. AUQUIERI*, nov. sp.)

par H. FOLEY.

(avec la planche III).

En poursuivant, à Beni-Ounif de Figuig (Sud-Oranais), des recherches sur le debab, trypanosomiase des dromadaires, nous avons eu l'occasion d'observer dans le sang des chiens de la région qui nous servaient d'animaux d'expérience deux microfilaires : l'une de ces microfilaires est *Mf. immitis* ; l'autre n'a pas encore été décrite.

D'après Neumann (1), cinq espèces de microfilaires peuvent se rencontrer dans le sang du chien. Ce sont les embryons des filaires suivantes :

Dirofilaria immitis (Leidy).
D. repens (Railliet et Henry).
D. Ochmanni (Full.).
Acanthocheilonema reconditum (Grassi).
A. dracunculoides (Cobb).

La *Mf.* d'Ochmann est la seule *Mf.* du chien qui soit enveloppée d'une gaine.

I. — *Mf. immitis.*

Cette espèce est cosmopolite (Railliet et Henry).

Elle paraît très fréquente chez les chiens du Sud-Oranais. Sur une première série de 33 chiens examinés à Beni-Ounif, en février et mars 1913 (2 lames par animal), nous l'avons rencontrée 13 fois. Sur 30 chiens examinés à Figuig en mai 1920 (une lame par animal), nous l'avons rencontrée une fois : soit 14 fois sur 63 animaux. Elle est certainement beaucoup plus fréquente que ne l'indique cette proportion de

(1) L. G. Neumann. *Parasites et maladies parasitaires du chien et du chat*, 1914.

22 p. 100 obtenue par une recherche très sommaire. Il s'agit de chiens indigènes, communément dits chiens kabyles, ou de croisements de chiens de cette race avec des chiens de races diverses introduits par les Européens. Employés comme chiens de garde, ils vivent constamment à l'extérieur.

Aucun des animaux parasités ne présentait des troubles attribuables à la filariose.

Examinée *à frais*, *Mf. immitis* se tortille ou s'entrelace activement sur place, mais quitte lentement le champ du microscope, même celui de l'immersion à 1/15. La striation est assez visible. Pas de gaine. Queue très effilée. Après vingt-quatre et même après quarante-huit heures, sous lamelle bordée à la vaseline, les mouvements sont encore assez actifs.

L'extrémité céphalique porte un stylet animé, semble-t-il au premier abord, de mouvements de propulsion très énergiques. En réalité, et ceci est bien visible lorsque la tête se présente par le côté, le stylet est constitué par une languette pointue, légèrement arquée, qui se relève par un mouvement de ressort, de détente brusque, comme un clapet. Il ne reste abaissé que par intermittences brèves, dans la position 2, et plus longtemps relevé dans la position 1, donnant l'aspect indiqué par les figures 1 et 2 (pl. III).

Sur les frottis colorés, *Mf. immitis* se montre habituellement contournée sur elle-même, parfois enroulée en spirale, rarement rectiligne sur toute son étendue. Tête arrondie, très légèrement atténuée au sommet. Striation de la cuticule à peine visible, sauf sur la fine extrémité caudale dépourvue de noyaux.

Par le Giemsa (1), les noyaux peu serrés, ovalaires ou arrondis, prennent une forte coloration rouge violacé (pl. III, fig. 3-4).

Les taches affectent les dispositions suivantes :

Espace céphalique, de longueur un peu variable, mal limité en arrière, à cause de la dissémination des premiers noyaux, les latéraux s'avançant inégalement et souvent débordant les médians ;

Tache oblique, toujours bien nette, occupant presque toute la largeur de l'embryon ;

(1) Giemsa faible (au 1/40), suivant la technique que nous avons préconisée. Ces *Annales*, n° 1, janvier 1913, p. 7.

Tache en V. Elle n'occupe ordinairement qu'une partie de la largeur du corps ; aucun détail de structure n'y est visible ;

Tache caudale paraissant presque aussi constante que les précédentes ; elle occupe, sous l'aspect d'une aire ovale claire, les 2/3 de la largeur du corps.

Au delà de cette tache, les noyaux se disposent presque immédiatement en une seule file ; la queue se termine par une pointe très effilée dépourvue de noyaux.

Le *corps central* ne se colore pas habituellement par le Giemsa. Il est parfois cependant, mais rarement indiqué par un cordon d'un rose violacé, grossièrement granuleux, légèrement renflé aux deux extrémités (pl. III, fig. 4). Mais à son niveau les noyaux sont très espacés, ce qui rend la zone correspondant au corps central bien apparente après coloration.

Les dimensions, suivant la règle, sont variables, non seulement avec l'épaisseur, la dessiccation plus ou moins rapide des étalements, le fixateur employé, etc., mais suivant l'habitus des microfilaires examinées. Aussi les dimensions données par les auteurs varient-elles toujours dans de larges limites. Il est préférable, croyons-nous, de relever les dimensions d'un certain nombre d'échantillons se présentant dans de bonnes conditions d'examen, comme nous le faisons ci-dessous :

Longueur totale	253	195	195	190	190	175
Largeur maxima	5	6	5	6	5	5,8
Longueur de l'espace céphalique	10	7	—	8	—	8
Distance de l'extrémité céphalique à la tache oblique	51	44,5	36	37,5	33	37,5
Distance de l'extrémité céphalique à la tache en V	71	55,5	58	60	52	55
Distance de l'extrémité céphalique à la tache caudale	190	153	—	—	140	141
Distance de l'extrémité céphalique au corps central	—	89	96	—	81	87
Longueur de l'espace clair correspondant au corps central	—	34	24	26	—	30
Longueur de la portion caudale dépourvue de noyaux	20	21	17	—	14	—

(Dimensions en μ : frottis fixés à l'alcool absolu, colorés à l'hématéine ou au Giemsa.)

* * *

Nous avons étudié, sur un chien fortement parasité, la périodicité de cette *Mf.* ; elle ne nous a pas paru nette. Suivant les jours, les microfilaires variaient considérablement de nombre,

et nous les avons trouvées également rares ou nombreuses sur des frottis prélevés pendant le jour ou pendant la nuit.

Nous avons recherché sans résultat les filaires adultes dans les cavités cardiaques, les gros vaisseaux d'un chien dont le sang renfermait des *Mf.* nombreuses.

II. — *Mf. Auquieri*, nov. sp.

A côté de *Mf. immitis*, moins fréquente que celle-ci, nous avons rencontré une autre *Mf.* non encore décrite, croyons-nous, et dont nous n'avons pu découvrir la forme adulte. Nous proposons de lui donner le nom de *Mf. Auquieri*, la dédiant à la mémoire de notre ami le D[r] Auquier, médecin de Figuig, mort victime de son dévouement, le 21 mai 1919, par suite de typhus exanthématique contracté en soignant les indigènes.

Nous avons rencontré cette *Mf.* quatre fois sur les 63 chiens constituant les deux séries indiquées précédemment (soit 6,4 p. 100). Une fois elle coexistait avec *Mf. immitis.*

Examinée à *frais*, c'est une *Mf.* très courte, animée de mouvements peu actifs sur place, quittant rarement et très lentement le champ de l'immersion à 1/15. Pas de gaine. La striation peu visible est apparente surtout sur les bords. L'extrémité antérieure est arrondie, à peine atténuée; on y distingue une collerette circulaire faiblement dentelée formant prépuce, qui découvre légèrement dans ses mouvements de rétraction l'extrémité arrondie de la tête; au centre de celle-ci se voit une double papille, sans stylet.

Après coloration par le Giemsa faible, cette microfilaire se montre trapue, dépourvue de gaine, rigide d'aspect et prend une disposition habituellement rectiligne avec une seule courbure vers le milieu ou à la pointe, offrant rarement dans sa longueur une ou deux ondulations. La fine striation de la cuticule n'est visible que sur les bords. Les noyaux, pressés, irréguliers, occupant sur toute la longueur la totalité de l'épaisseur du corps, prennent une coloration bleu outremer; ceux de l'extrémité ont souvent une teinte rougeâtre. Le dernier noyau n'atteint pas tout à fait l'extrémité caudale qui s'atténue brusquement en une pointe courte et très aiguë (pl. III, fig. 5, 6).

Les taches affectent les dispositions suivantes :

Espace céphalique très court, les premiers noyaux, souvent disposés en colonnes longitudinales, atteignant presque l'extrémité de la tête ;

Une *tache oblique* constante, bien nette, à bords parallèles, occupant toute la largeur du corps de l'embryon ;

Une *tache caudale* souvent absente, toujours peu distincte.

Le Giemsa ne révèle pas l'existence d'un *corps central.*

Cette *Mf.* est caractérisée surtout par ses dimensions, sa brièveté remarquable et son épaisseur relative. La longueur totale varie d'ailleurs, suivant la règle, dans de larges limites.

Longueur totale	58	79	82	89	94	98	100	102
Largeur maxima	6	7,5	6,5	7	7,5	8	8	7
Longueur de l'espace céphalique	—	2,5	—	—	3	—	—	—
Distance de l'extrémité céphalique à la tache oblique	13,5	19	19	20	20	22	20	20
Distance de l'extrémité céphalique à la tache caudale	—	—	44	—	—	—	—	78
Longueur de la pointe caudale sans noyaux	—	7	—	—	6	8	9	8

(Dimensions en μ; frottis colorés au Giemsa.)

Il ne nous paraît pas douteux que cette *Mf.* soit nouvelle.

Les caractères comparatifs des deux *Mf.* que nous avons étudiées montrent suffisamment que *Mf. Auquieri* est tout à fait différente de *Mf. immitis*. La *Mf.* de *Dirofilaria repens* a des dimensions supérieures encore à celles de *Mf. immitis*. Elles varient, d'après Railliet et Henry (1), de 300 à 360 μ sur 6,5 à 8 μ. Elle est donc de trois à six fois plus longue que la nôtre. *Mf. recondita* mesure, d'après Noe, 216 μ sur 4 μ 30 ; elle est beaucoup plus longue et plus grêle que *Mf. Auquieri*. Il en est de même des embryons de *A. dracunculoides*, qui mesurent de 195 à 230 μ sur 5 à 5 μ 5, et dont les caractères présentent une grande ressemblance avec ceux des embryons de *Dirofilaria immitis*, d'après Railliet et Henry (2). Enfin, la *Mf. d'Ochmann*, longue de 320 μ d'après Fulleborn, est pourvue d'une gaine.

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, 1911, **4**, p. 485.
(2) *Ibid.*, 1912, **5**, p. 392, 395.

*
* *

Mf. Auquieri ne nous a montré aucune périodicité nette, pas plus que *Mf. immitis*. Peut-être la périodicité de ces microfilaires (celle de *Mf. immitis* a été signalée par différents auteurs, en particulier P. Manson) est-elle troublée par les habitudes des chiens indigènes dont le sommeil est très irrégulier. Ils passent somnolents une partie du jour, et, chiens de garde vigilants, se livrent à des aboiements furieux autour des tentes pendant plusieurs heures de la nuit.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

Fig. 1 et 2. — *Mf. immitis*. Aspects de l'extrémité céphalique à l'état frais.
1. Stylet relevé.
2. Stylet abaissé.

Les figures suivantes ont été dessinées à la chambre claire à 45°; oc. comp. 4; obj. à imm. 1/15 (Stiassnie); tube à 160°. Coloration au Giemsa à 1/40, après fixation à l'alcool absolu.

Fig. 3 et 4. — *Mf. immitis*. La figure 4 montre une ébauche du corps central.

Fig. 5 et 6. — *Mf. Auquieri*.

LES MICROBES DU LAIT

UNE ESPÈCE BANALE DE FERMENT LACTIQUE TRÈS FRÉQUENTE DANS LE LAIT :

LE STREPTOCOQUE LACTIQUE GLAIREUX

par H. VIOLLE

On trouve dans les laits et ses dérivés un microbe dont les cultures, sur gélose, offrent l'aspect de larges coulées de cristal. Ce micro-organisme a la forme des streptocoques; il donne de l'acide lactique, aux dépens de la plupart des sucres; il forme également dans les milieux sucrés une substance glaireuse.

Pour rappeler ce triple caractère, nous proposons de l'appeler « streptocoque lactique glaireux ».

Nous avons étudié ce microbe parce qu'à notre connaissance aucune monographie n'en a été faite. Cependant il est extrêmement répandu dans tous les laits, crèmes, beurres, fromages, que l'on trouve sur le marché de Paris : son histoire présente bien des faits intéressants.

I. — Etiologie.

Le streptocoque lactique glaireux se trouve vraisemblablement dans la plupart des laiteries; il y est amené par l'eau, le sol et les aliments. Son développement est extraordinairement accru par la présence, dans le milieu de culture, de nitrites; on peut en inférer qu'il se développe ou persiste fort longtemps dans les eaux et les terrains qui renferment ces sels.

Nous verrons qu'il donne d'abondantes cultures dans les milieux sucrés, et particulièrement dans les milieux saccharosés; il se développe remarquablement bien dans les jus de

betteraves; on le trouve également à la surface de ces racines et dans la terre qui les entoure. Il s'ensuit qu'il est introduit dans les fermes de maintes façons. Ainsi très répandu dans les étables, sitôt la traite, il contamine les laits.

Orla Jensen pense que ce groupe de microbes, entraîné avec la nourriture donnée aux vaches, passe dans l'intestin,



Fig. 1. — Le streptocoque lactique glaireux.

de là dans la circulation générale, et finalement dans le lait. C'est possible, mais non démontré.

Quoi qu'il en soit, la présence du streptocoque lactique glaireux dans un lait indique :

1° Que ce lait a été contaminé;

2° Que la contamination a eu lieu immédiatement après la traite, à la laiterie ou ses environs, soit naturellement par l'adjonction de particules de terre, de végétaux, d'excréments, etc., soit artificiellement par l'addition d'eau;

3° Que la stérilisation a été insuffisante, puisque la simple pasteurisation à 60° pendant vingt minutes le détruit.

L'isolement du streptocoque lactique glaireux dans un lait

est donc intéressant; facile à pratiquer, on devra donc toujours le faire, lors d'une analyse bactériologique.

II. — Morphologie.

Le streptocoque lactique glaireux offre l'aspect de chaînettes de cocci (fig. 1), analogues à celles des streptocoques pathogènes. On constate d'assez grandes variétés morphologiques ; les chaînettes peuvent être fort longues et présenter 15, 20, 25 cocci et même plus. Généralement bien isolées les unes des autres, elles sont cependant parfois très enchevêtrées, formant des pelotons très embrouillés. Dans d'autres circonstances, les chaînettes sont très courtes : elles ont fait place à des diplocoques ressemblant en tous points à des pneumocoques.

On est frappé, particulièrement lors d'examens de cultures anciennes, par l'inégalité des grains dans une même préparation ; à côté d'éléments petits, d'autres apparaissent gros et renflés ; ici l'on voit des grains pâles prenant à peine les colorants, d'autres surchargés de matière tinctoriale.

Ses dimensions sont en moyenne de 0 μ, 1 à 1 μ

Le streptocoque est entouré d'une capsule mucilagineuse. Cette enveloppe est très petite; assez nette dans les cultures jeunes, un peu floue dans les cultures âgées, elle semble avoir disparu totalement dans les vieilles cultures. Les milieux liquides paraissent plus propices à sa formation.

Pour la mettre en évidence, on fera des frottis très minces. S'ils sont préparés avec du lait, on colorera par la fuchsine de Ziehl qui teinte caséine et microbe à l'exclusion de la capsule qui apparaîtra ainsi négativement sur un fond rose

Le streptocoque lactique glaireux est immobile.

III. — Coloration.

Il se teinte facilement par toutes les couleurs d'aniline. Il reste coloré par le procédé de Gram. Cette méthode est à employer lorsqu'on fait des frottis avec du lait, car, dans ce cas, le bacille se détache très nettement en violet sur un fond incolore de caséine.

Le bleu de méthylène ne mettra pas en évidence des grains de volutine, car ces capsules ne se rencontrent que dans les espèces lactiques à forme allongée. Si l'on emploie ce colorant, on n'oubliera pas de le faire agir sur un milieu de culture préalablement neutralisé.

IV. — Cultures.

Le streptocoque lactique glaireux ne se développe que dans les milieux nutritifs sucrés. Toutefois, il présente encore quelque développement dans les autres milieux banaux parce que ces milieux renferment presque toujours des traces de sucre, suffisantes pour amorcer la prolifération.

Les milieux organiques végétaux semblent plus propices que les milieux organiques animaux. Ainsi le bouillon de haricots est-il supérieur au bouillon de viande.

Certains sels minéraux semblent jouer un rôle important : ainsi le nitrate de soude ajouté en quantité assez prononcée (1 p. 100) dans un milieu de culture donne un essor remarquable à la prolifération du streptocoque.

De ces faits, il résulte qu'on prendra comme milieu de choix le bouillon ou la gélose aux haricots, sucrée et nitratée (saccharose : 2 p. 100 ; nitrate de soude : 1 p. 100).

Bouillon. En l'espace de 6 à 8 heures, on constate déjà dans le bouillon un léger développement; en 24 heures, la culture est à son maximum ; le bouillon est trouble, homogène avec ondes moirées. Le milieu est légèrement visqueux, gommeux. Il ne se forme point de voile à la surface.

Au fond du tube se constitue un dépôt blanc, comparable à une pâte de porcelaine, et formé par un amas de microbes.

Dans les milieux anaérobies (bouillon avec huile de vaseline, piqûres en gélatine, en gélose) il se développe parfaitement bien. On peut ainsi le considérer indifféremment comme aérobie ou anaérobie. Ceci explique sa résistance dans la nature, tant à la surface que dans la profondeur des eaux et du sol.

Dans la *gélatine* à 30°, développement peu prononcé. Trouble uniforme, avec formation dans toute la masse de petits grumeaux d'agglutination.

Dans la *gélatine* à 15°, en piqûre profonde : développement assez lent, uniformément réparti sur tout le trajet de la piqûre, avec çà et là des renflements. Aucune liquéfaction, aucune dislocation du milieu.

Sur *gélose* inclinée (gélose aux haricots sucrée) l'aspect est caractéristique : surface glaireuse, visqueuse, translucide ressemblant à du silicate de potasse ou encore à une couche de verre ou même à de la paraffine en fusion. Le développement est extrêmement rapide; en vingt-quatre heures : traînée épaisse et large. Si le tube est maintenu vertical, la culture « coule ».

Sur *gélose*, en boîtes de Petri, les colonies âgées de vingt-quatre heures sont arrondies, ont de 1/2 à 3/4 de centimètre de diamètre et même davantage; translucides, d'abord légèrement surélevées, elles s'aplatissent bientôt dès qu'elles augmentent de dimensions, car leur fluidité les pousse à s'étaler. Agées, elles forment des granulations et jaunissent. Ces granulations ressemblent à des bourbillons de pus et sont formées d'amas de bactéries agglutinées.

Sur *gélose* inclinée ordinaire le développement est extrêmement lent. Les colonies offrent l'aspect de celles de streptocoques et particulièrement de streptocoques lactiques; les colonies isolées atteignent au maximum la grosseur d'une tête d'épingle. Ensemencé en profondeur, dans la gélose aux haricots sucrée, le microbe se développe dans toute l'étendue de la piqûre. Pas de dislocation du milieu.

V. — Vitalité.

Laissé à l'air libre, il se développe avec d'autant plus de rapidité que la température se rapproche de 30°. Les colonies commencent à croître vers 10°.

Des tubes de culture, ensemencés avec le microbe et placés au bain-marie à 45-46°, ne présentent aucune trace de développement. Mais cette température est seulement inhibitrice de la croissance du streptocoque lactique glaireux; elle n'est pas destructrice de sa vitalité; replacée, dans les conditions normales, la culture se développe.

Les cultures laissées à 60° pendant une demi-heure au bain-marie sont tuées.

A la température ordinaire, les cultures sur gélose inclinée meurent environ en un mois.

Les milieux de culture dans lesquels pousse le streptocoque lactique glaireux ne dégagent aucune odeur. Les cultures jeunes en milieu liquide donnent peut-être un léger arome de lait, analogue à celui qui émane des cultures de bacilles lactiques. Les vieilles cultures ont perdu ce parfum.

VI. — Réactions biologiques.

Albuminoïdes. — Le streptocoque lactique glaireux n'attaque pas les matières albuminoïdes, tout au moins lorsque ce milieu contient encore du sucre aux dépens duquel il peut vivre. Nous verrons plus loin, cependant, qu'un corps généralement inattaqué peut être décomposé si le milieu de culture est extrêmement nutritif; à un grand développement correspond généralement la formation de diastase abondantes.

Il n'attaque point la caséine du lait : on ne trouve ni peptones, ni polypeptides, ni acides aminés, dans le lait ensemencé avec ce microbe.

Il utilise vraisemblablement les acides aminés, tels qu'on les trouve, à l'état de composés dans les matières organiques végétales. Dans le bouillon de haricots sucré, par exemple, on note, en effet, une diminution sensible des acides aminés, après quelques jours de culture.

Il ne semble point former de peptones aux dépens des albuminoïdes végétales.

La réaction de l'indol est toujours négative.

Hydrates de carbone. — Les hydrates de carbone sont pour la plupart attaquées par le streptocoque lactique glaireux. Cette dislocation est d'ailleurs variable, dépendant de la matière hydrocarbonée, de la nature du milieu de culture, de sa composition [teneur en sels minéraux ou organiques, en sucres, en azote, etc.]; ainsi l'amidon, inattaquable dans l'eau peptonée ordinaire, se décompose aisément dans un milieu sucré (saccharose), azoté et minéralisé (nitrate d'ammonium).

A. Dissaccharides : 1° *Lactose*. — Le lactose est décomposé; le milieu de culture devient acide (acide lactique).

Dans le bouillon lactosé à 2 p. 100, cette acidité n'est d'ailleurs jamais très prononcée ; elle est, en outre, lente; elle atteint en moyenne par litre 3 gr. 5 d'acide (exprimé en acide lactique). Elle est analogue dans le lait. Ce chiffre est incompatible avec la coagulation du lait à la température du laboratoire. Mais cette acidité faible l'a cependant « sensibilisé » à la coagulation.

L'action de la lactase est très renforcée par l'adjonction de nitrate de soude, dans le milieu de culture.

2° *Saccharose*. — Le streptocoque lactique glaireux attaque le saccharose avec plus d'intensité que le sucre de lait; il donne 5 gr. 5 environ d'acide exprimé en acide lactique par litre. On sait que les bacilles lactiques ordinaires donnent en moyenne 10 gr. d'acide lactique par litre.

Ce microbe contient donc de la sucrase. Les solutions de bouillon de haricots additionné de sucre de canne, et ensemencées avec le streptocoque lactique glaireux réduisent en effet la liqueur de Fehling.

Les bacilles lactiques ne possèdent cette propriété que morts : l'invertine est une endodiastase, un ferment figuré; dans les cas du streptocoque lactique glaireux, le pouvoir hydrolysant se manifeste dans les cultures jeunes, en pleine activité; sa sucrase est donc bien, comme dans le cas de la levure de bière, une exodiastase ou ferment soluble.

Les bacilles lactiques et mieux pseudo-lactiques sont souvent les agents de fermentations acides variées donnant :

1° Des acides monobasiques (acides formique, acétique, propionique, butyrique et valérianique) ;
2° Des acides bibasiques (acides oxalique et succinique);
3° Des acides-alcools (acides lactique, malique, tartrique et citrique).

Le streptocoque lactique glaireux donne :

1° De l'acide lactique en quantité importante ;
2° De l'acide acétique en petite proportion (nous avons trouvé 0 gr. 73 d'acide acétique par litre);
3° Des traces d'acide formique.

Voici les chiffres trouvés lors de distillations fractionnées (méthode de Duclaux) :

Bouillons de culture sucrés ensemencés avec le streptocoque lactique glaireux	Tableaux comparatifs de G. Bertrand	
	Acide acétique	Acide formique
7,7	7,4	5,9
15,4	15,2	12,2
23,3	23,4	19,0
31,4	32	26,4
40,2	40,9	34,4
49,2	50,5	43,2
58,9	60,9	52,8
69,8	71,9	64,6
82,9	84,4	79,6
99,3	100	100

3° *Maltose*. — Le maltose est attaqué au même titre que le lactose.

B. Pentoses. — Le xylose n'est pas attaqué.

C. Hexoses. — Le glucose et le lévulose ne sont pas attaqués.

D. Polysaccharides. — Ni l'amidon, ni l'inuline, ni les dextrines sont attaqués.

Les cultures sur milieu saccharosé sont visqueuses et légèrement fluorescentes. La viscosité du liquide est due à la formation d'un corps voisin du glycogène, et formé vraisemblablement aux dépens du sucre de canne et non de la capsule mucilagineuse, car dans les milieux non saccharosés, tel que le lait où le bacille est encapsulé, le caractère de viscosité fait défaut.

Ce corps ne réduit pas la liqueur de Fehling, mais, après action des acides dilués, il donne du glucose comme l'indiquent le titrage par la liqueur de Fehling, la nature de l'ozazone et la valeur du pouvoir rotatoire.

Le lactose moins fortement attaqué que le saccharose ne donne qu'une très légère viscosité. Il en est de même de tous les autres sucres. Le lait reste donc fluide, sauf dans le cas,

où primitivement condensé, il a subi une addition de saccharose.

Alcools. — Le bacille lactique glaireux ne renferme pas de diastases attaquant la glycérine, la sorbite ou la mannite.

Diastases réductrices. — Le streptocoque lactique glaireux ne paraît point former de diastases réductrices.

1° *Milieu au sous-acétate de plomb.* — Aucune réduction du milieu. La gélose ensemencée et la gélose témoin conservent toutes deux leur coloration blanchâtre.

2° *Milieu au rouge neutre.* — Aucune réduction du milieu. La gélose ensemencée et la gélose neutre conservent toutes deux leur coloration primitive rouge cerise.

3° *Milieu au nitrate de potassium.* — Aucune réduction du milieu : réaction de Tromsdorff négative.

4° *Milieu au bleu de méthylène* :

a) Milieu solide (culot de gélose sucrée aux haricots additionnée de bleu de méthylène) :

Témoin.	Coloration bleue dans toute l'étendue.
Bacille lactique	Décoloration de la zone médiane. Coloration bleue à la surface et à la profondeur.
Bacille lactique glaireux.	Décoloration de la zone médiane. Coloration bleue à la surface et à la profondeur.

b) Milieu liquide (lait + bleu de méthylène) :

Témoin.	Coloration bleue dans toute l'étendue.
Bacille lactique	Décoloration totale de la zone médiane et du fond. Bleu très léger à la surface.
Bacille lactique glaireux.	Décoloration totale de la zone médiane et du fond. Bleu fort à la surface.

Diastases oxydantes. — Ne renferme point de diastases oxydantes.

a) *Catalase.* — Addition d'eau oxygénée au lait ensemencé de streptocoque lactique glaireux : pas de dégagement de gaz.

b) *Peroxydases.* — Au lait ensemencé additionné de teinture alcoolique de gaïacol et d'eau oxygénée : aucune modification de coloration du milieu.

c) *Oxydases.* — Addition au lait ensemencé de teinture alcoolique de gaïacol : aucune modification de coloration du milieu.

Diastases hémolytiques. — Le streptocoque lactique glaireux ne renferme pas de diastases hémolytiques : en milieu sucré isotonique ensemencé avec le bacille lactique glaireux, les globules rouges ne sont pas hémolysés.

Action lytique de la bile. — Le streptocoque lactique glaireux n'est pas attaqué par la bile. Il ne subit au contact de ce corps complexe aucun phénomène lytique appréciable. Il en est de même avec le taurocholate de soude.

VII. — Symbiose.

Le bacille lactique glaireux se trouve la plupart du temps dans les produits lactés, en compagnie d'une flore plus ou moins abondante qui modifie plus ou moins le lait. Il en résulte qu'il résiste et même croît indifféremment en milieu neutre, alcalin ou acide. Il se développe parfaitement avec le bacille lactique vrai, le *B. subtilis*, le *B. lactis ærogenes*, etc. Cette constatation est importante, car le bacille lactique vrai entrave généralement toute flore concomitante.

VIII. — Caractères pathogènes.

Homme. — Le streptocoque lactique glaireux est un microbe banal, dénué de tout pouvoir pathogène pour l'homme, qui en absorbe journellement avec le lait, le beurre, des quantités appréciables.

Animaux de laboratoire. — Les diverses expériences faites chez les animaux ont été négatives.

Lapins.. 10 c.c. de bouillon de culture de 24 h. en injection intrapéritonéale : Aucune réaction morbide.

Cobayes. 5 c.c. de bouillon de culture de 24 h. en injection intrapéritonéale : Aucune réaction morbide.

Souris .. 1 c.c. de bouillon de culture de 24 h. en injection sous la peau : Aucune réaction morbide.

— 1 c.c. de bouillon de culture de 24 h. en ingestion : Aucune réaction morbide.

Plantes [Betteraves]. — Nous avons pensé que le streptocoque lactique glaireux, proliférant activement dans les mi-

lieux saccharosés, se développerait peut-être dans les tissus des végétaux contenant du sucre. Quelques jours après avoir été inoculé dans le corps de betteraves, on constate au point d'inoculation un léger développement et un envahissement des tissus ambiants sur une zone de 1/2 centimètre de profon-

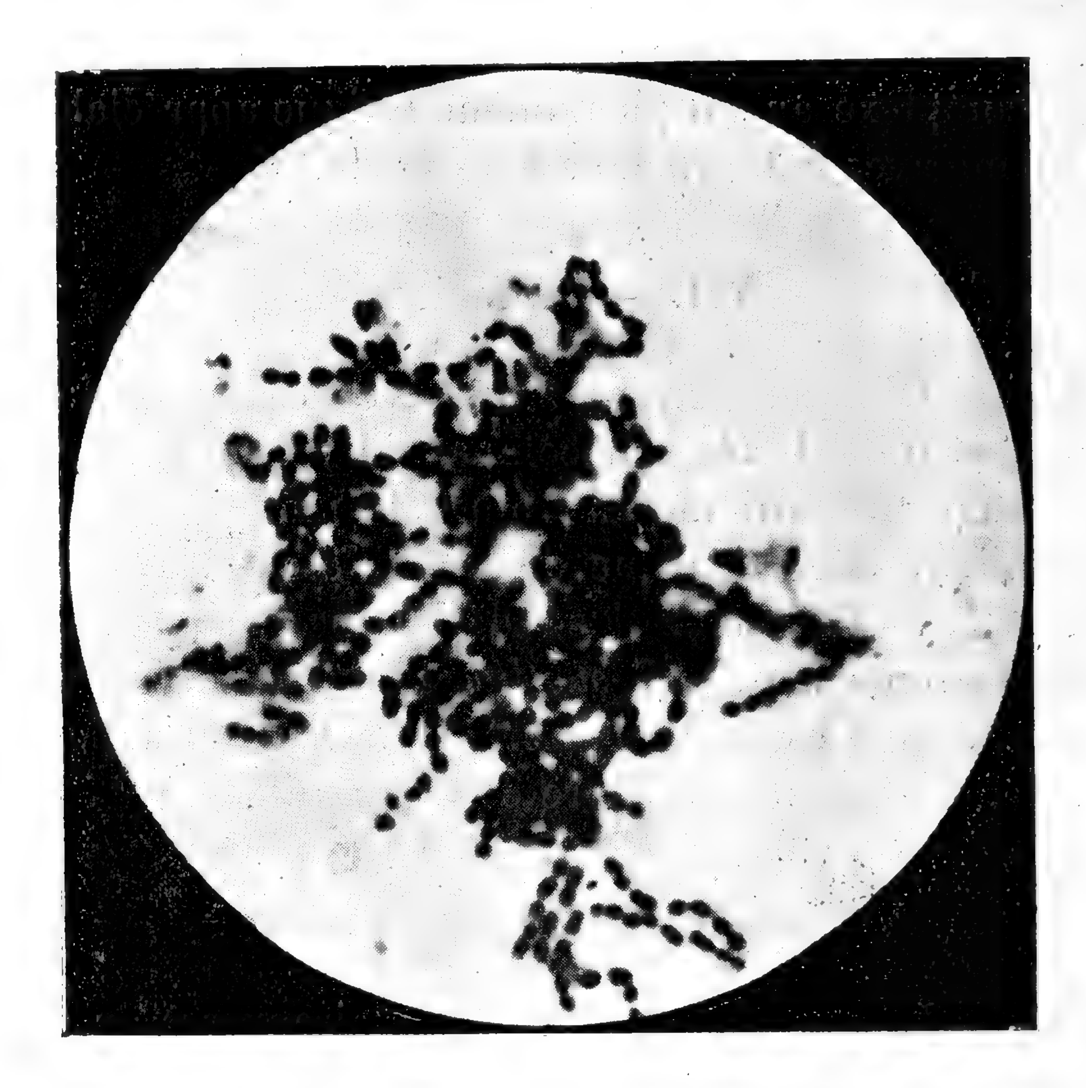


Fig. 2. — Agglutination du streptocoque lactique glaireux par le sérum spécifique.

deur environ ; les tissus sont transformés en produits visqueux gommeux, analogues à ceux formés par des cultures *in vitro* de streptocoque lactique glaireux.

IX. — Agglutination.

L'injection, à des lapins, de cultures de streptocoque lactique glaireux provoque dans l'organisme des anticorps agglutinants. Dix jours après une injection de 10 cent. cubes de culture de bouillon sucré de vingt-quatre heures à 30°, dans le péritoine, nous avons obtenu un sérum agglutinant à 1 p. 1.000 le microbe qui avait servi à l'inoculation (fig. 2).

Ce sérum n'agglutinait point par contre des cultures :
1° de streptocoque lactique ordinaire;
2° de streptocoque pathogène.

Tels sont les caractères que présente le streptocoque lactique glaireux.

L'absence de pouvoir pathogène, l'aspect des cultures et quelques caractères biologiques le séparent complètement des streptocoques pathogènes de l'homme (streptocoque pyogène) et de la vache (streptocoque des mammites contagieuses).

Il se différencie également par un certain nombre de facteurs des streptocoques lactiques, c'est-à-dire de ce groupe extrêmement important mais diffus des « ferments lactiques ».

Si l'on considère, avec Mazé, comme ferments lactiques vrais les microbes qui ne donnent exclusivement que de l'acide lactique, sans production de gaz, et n'attaquant pas sensiblement les matières albuminoïdes, le streptocoque lactique glaireux n'est pas un ferment lactique vrai.

Mais si l'on admet, avec Orla Jensen, que tout microbe immobile, sans spores, restant coloré par la méthode de Gram, donnant de l'acide lactique aux dépens de quelque sucre que ce soit, est un ferment lactique, le streptocoque lactique glaireux est un ferment lactique.

Dans une telle classification se trouvent associés les microbes les plus divers, streptocoques, bacilles filamenteux, sarcines, tetracocci, aux propriétés les plus opposées, c'est-à-dire les microbes lactiques et les microbes donnant de l'acide lactique, en réalité deux genres tout à fait différents : les bactéries lactiques et les bactéries paralactiques ou pseudo-lactiques.

Le microbe lactique glaireux est donc un microbe paralactique. De par ses caractères et ses propriétés, il constitue, comme nous venons de le voir, un type particulier de bactéries dont nous avons cru intéressant de décrire l'histoire.

Nous tenons à remercier M. Mazé de ses précieux conseils dans cette étude.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

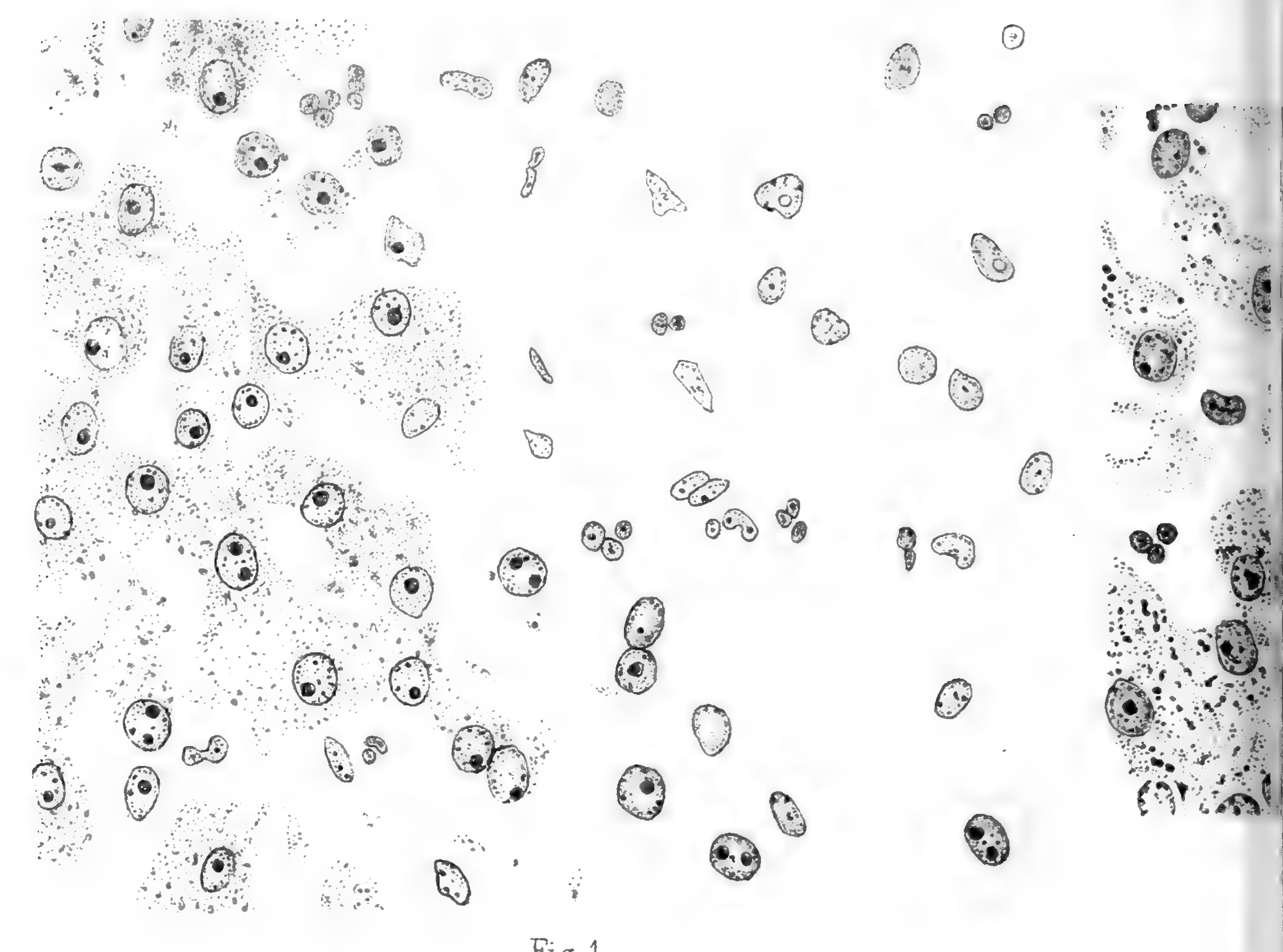
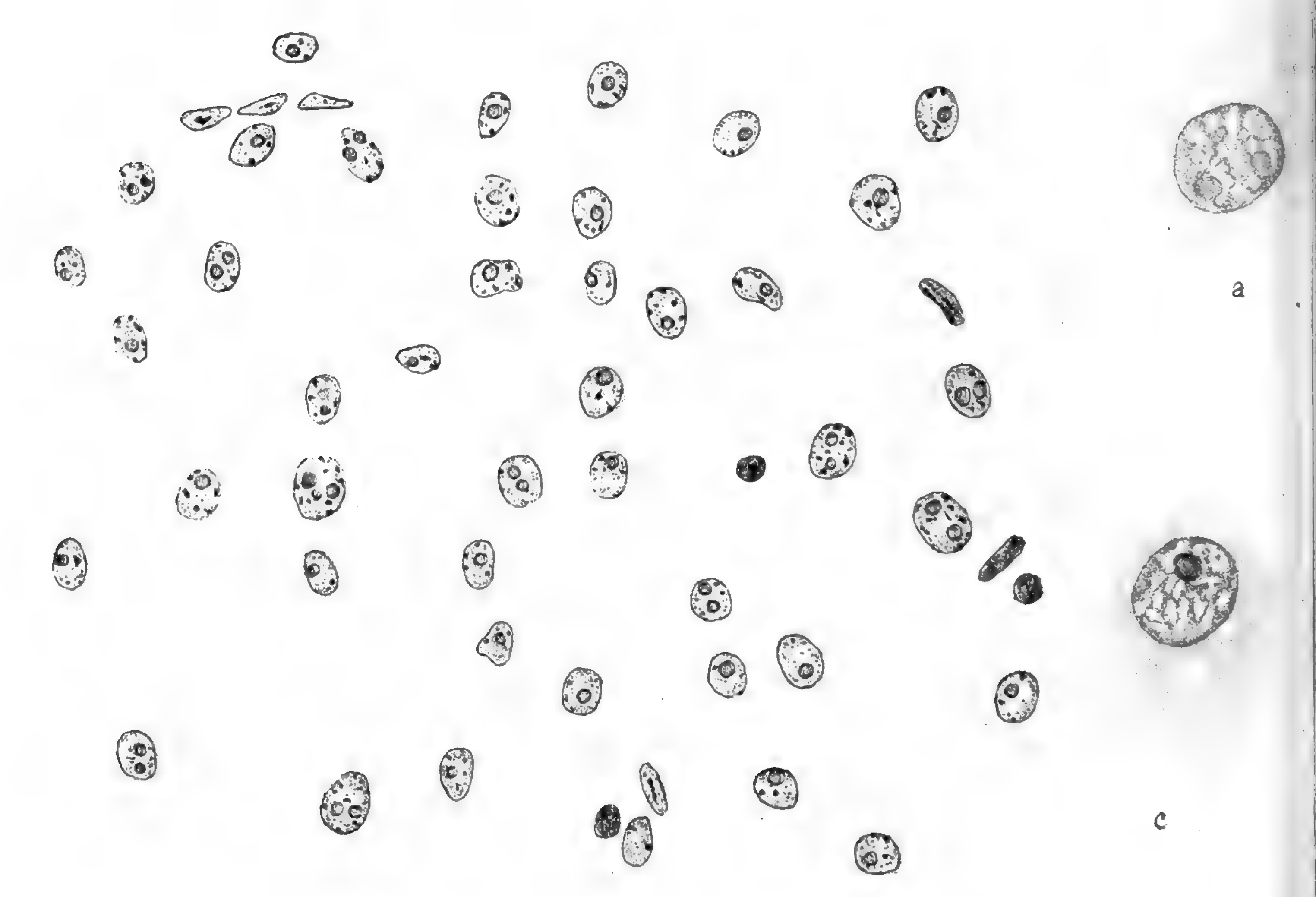
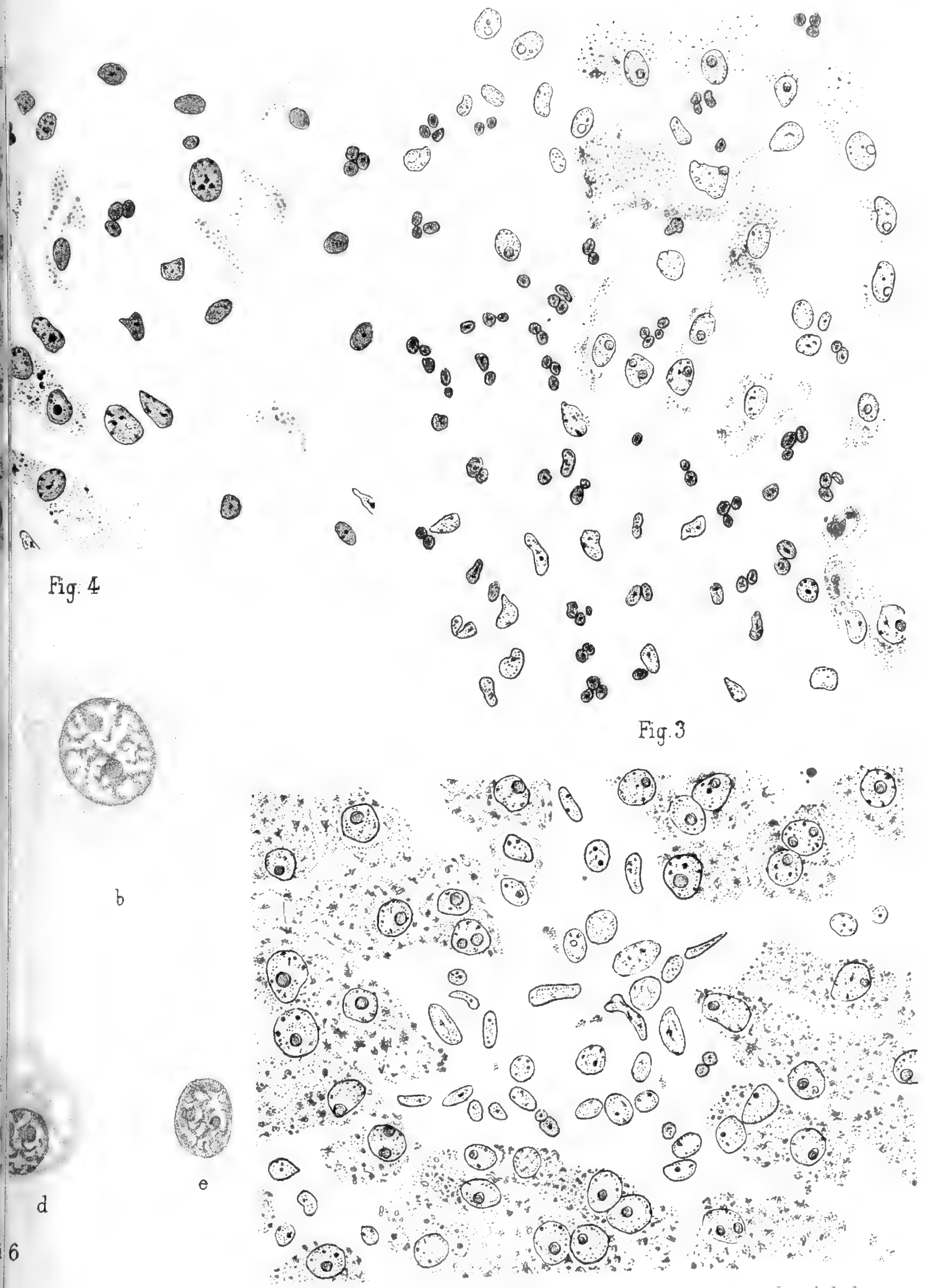


Fig. 1

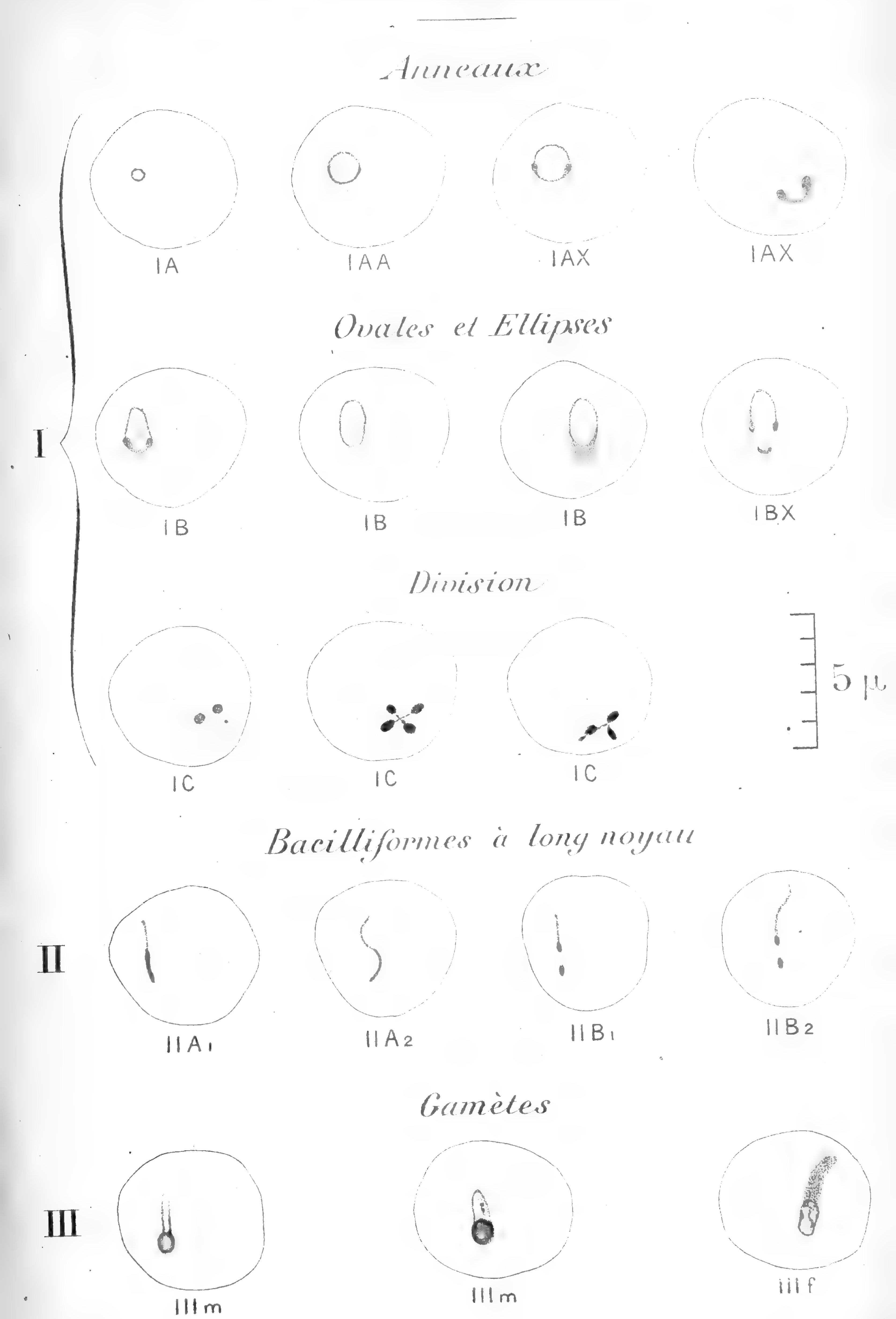


Constantin del.

Fig. 2

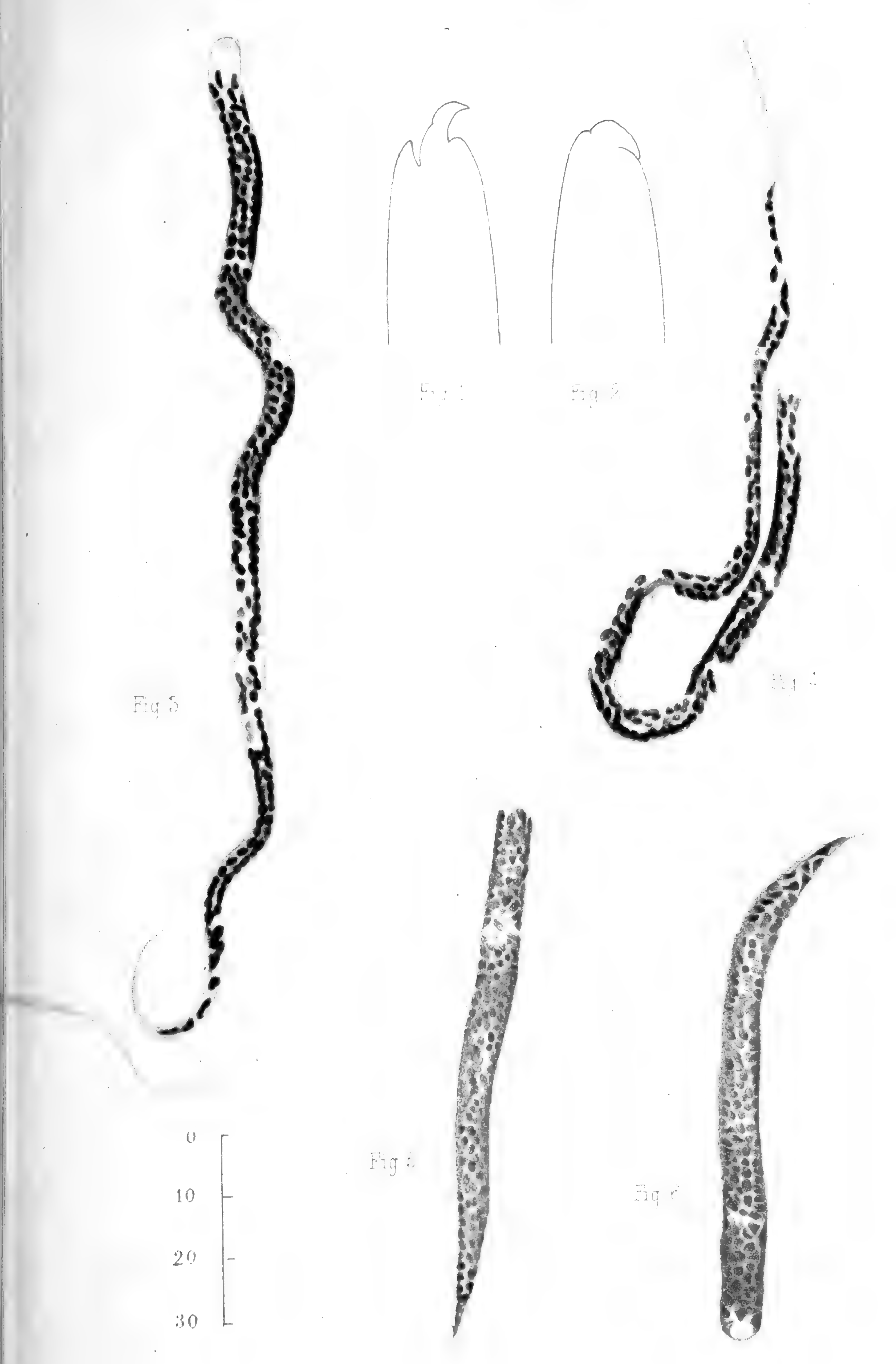


Imp. L. Lafontaine.



Sergent del. Imp. L. Lafontaine

Mém. Foley



Foley del
Imp. L. Lafontaine

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Avril — N° 4.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE M. PASTEUR

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — France : 45 francs; Union postale : 55 francs. Prix d'un Numéro : 4 francs.

Secrétaire de la Rédaction : Camille RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921	......	FRANCE	45 fr.
— — — —	......	UNION POSTALE.	55 fr.
Prix du numéro, — —	....		4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément.
TABLES DES MATIÈRES, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 4

Page

Mémoires publiés à l'occasion du Jubilé de Élie Metchnikoff, réunis e un volume grand in-8° de 724 pages et 20 pl. en noir et en couleurs, précédés c compte rendu du Jubilé du 16 mai 1915, avec portrait de E. METCHNIKOFF. — Pari Masson et C[ie], 50 francs.

LYSOL

LE PLUS PUISSANT DES ANTISEPTIQUES-DÉSINFECTAN
DÉRIVÉS DU GOUDRON

ENTIÈREMENT SOLUBLE DANS L'EAU

Le **LYSOL**, recommandé par les médecins et les savants les p éminents, est le meilleur préservatif des maladies épidémique **Grippe, Influenza, Diphtérie, Fièvre typhoïde, etc.**

Les Dispensaires antituberculeux et, principalement, le Dispensa modèle de Lille, fondé et dirigé par le Dr Calmette, emploient **Solutions Lysolées,** de préférence à toutes autres, pour la d truction des germes malfaisants des crachats et du linge des tubercule

Savons de toilette antiseptiques au LYSOL, pour ÉCOLES, CRECHES, DISPENSAIRES, etc.

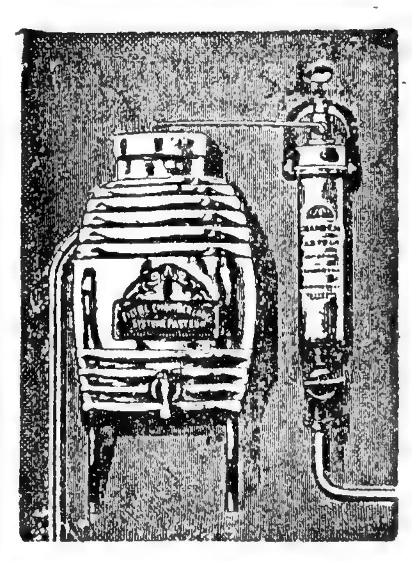
Eau Dentifrice antiseptique au LYSOL

Société Française du LYSO

65, rue Parmentier, à IVRY (Seine)

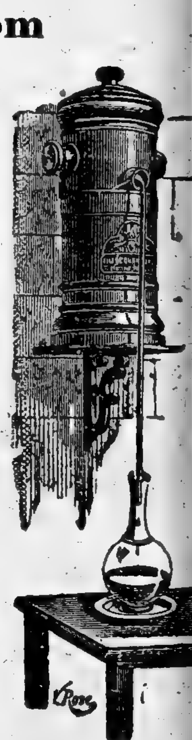
FILTRE CHAMBERLAND SYSTEME PASTEUR

Le seul autorisé par PASTEUR à porter son nom



2 Grands Prix (Exposition Universelle 1900)
5 Diplômes d'Honneur
12 Médailles d'Or ~~~ **Prix Montyon**
Médaille d'Or de la Société d'Encouragement pour l'Industrie Nationale.

Le SEUL pouvant s'opposer efficacement à la transmission des maladies par les eaux de boisson.



FILTRATION DE L'EAU

BOUGIES DE POROSITÉS GRADUÉES POUR LABORATOIRES

Siège social : 58, rue Notre-Dame-de-Lorette, PARIS

SOCIÉTÉ D'INSTALLATION ET D'ENTRETIEN

1, Rue Godot-de-Mauroi
(POUR PARIS ET LA BANLIEUE)

35e ANNÉE AVRIL 1921 N° 4

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

TUBES PLATS POUR SÉPARATION ET CULTURE MASSIVE DES MICROBES

par René LEGROUX.

Une des opérations les plus courantes en bactériologie consiste à extraire les divers germes qui peuvent coexister dans un produit, à en obtenir la culture, ce qui permet d'établir la nature et la quantité des microbes contenus dans le produit.

La première méthode de séparation, la méthode des plaques de Koch, consistait à incorporer à un milieu liquide solidifiable le mélange microbien, puis à examiner et dénombrer les colonies développées à la surface et dans la profondeur du milieu. D'autres fois, on épuisait le produit de ses germes en déposant la semence par stries parallèles à la surface du milieu nutritif. Dans les deux cas, les plaques superposées et enfermées sous de larges cloches étaient fréquemment contaminées et leur milieu séchait rapidement; l'emploi des tubes à essai des chimistes (laboratoire de Pasteur), ainsi que le remplacement de la gélatine par la gélose pour gélifier les liquides (1),

(1) Les milieux gélosés ont été employés au laboratoire de Pasteur vers l'année 1882. A cette époque, on y employait de petits cristallisoirs de 7 centimètres de diamètre à couvercle rodé en rainure, le pourtour du cristallisoir était percé d'une ouverture circulaire bouchée au coton. Après avoir coulé un milieu nutritif dans le fond du cristallisoir, la surface en était ensemencée par l'orifice latéral (communication orale de M. Roux).

constitua un progrès considérable sur la méthode de séparation de Koch. Le tube à essai permettait le filtrage de l'air à travers une bourre de coton et la conservation du milieu nutritif dans le récipient où avait lieu sa stérilisation; il facilitait la « pureté bactériologique » au cours des manipulations. Cependant lorsque parurent les boîtes de Pétri, leur usage se généralisa dans les laboratoires du monde entier, parce que la surface utile du milieu était large et facile à explorer.

A côté de ces avantages les boîtes de Pétri ont aussi leurs inconvénients :

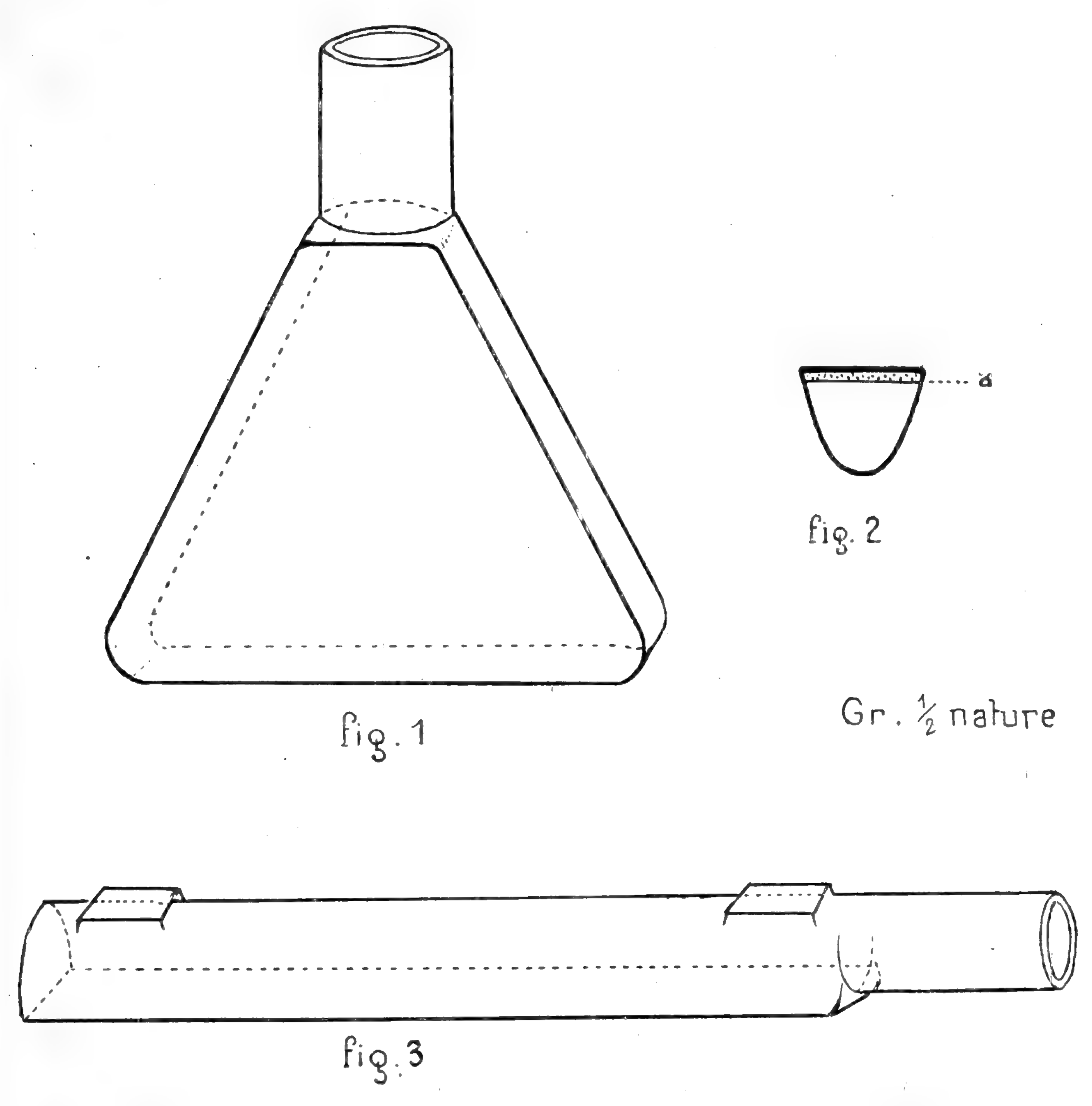
Avantages. — Large surface nutritive, d'une épaisseur uniforme, facilement accessible, d'où commodité pour examiner, même au microscope, les colonies développées.

Inconvénients. — Contamination presque fatale du milieu après quelques jours; dessiccation certaine; encombrement de l'appareil, constitué par deux pièces, mise hors d'usage par le bris ou la perte d'une pièce, prix élevé ; impossibilité d'y préparer à l'avance des milieux; difficulté de les transporter stérilement, même vides.

La fabrication des boîtes de Pétri n'existait pas en France avant 1914. Au début de 1915, plusieurs verreries (1) furent sollicitées par l'Institut Pasteur de fabriquer ces boîtes pour les laboratoires de l'Armée; cependant nous avons cherché à leur substituer un appareil plus commode et de fabrication plus facile. Nous avons voulu garder les avantages de surface et d'épaisseur uniforme de milieu que l'on possède avec les boîtes de Pétri, mais en donnant à notre appareil ce qui manquait à celle-ci. L'usine Lalique put mener à bien la fabrication d'une boîte triangulaire (fig. 1) de 54 centimètres carrés de surface alors que la boîte de 10 centimètres de diamètre en a 58. Elle possède un goulot que l'on bouche à l'ouate et qui peut être occlus par un capuchon de caoutchouc; sa forme triangulaire permet l'accès en tous les points à l'anse de platine ou à l'effilure de pipette. Son prix de revient est bien moindre que celui de la boîte de Pétri, enfin sa fabrication régulière était assurée par un mou-

(1) Cristalleries de Sèvres. Usine Lalique, Combs-la-Ville. Verreries de Souvigny (Allier).

lage fixe, unique. Cette boîte a des inconvénients qui ne peuvent pas la faire adopter pour le but cherché, elle est plus épaisse que la boîte de Pétri, plus encombrante, malgré le plat qui permet de la soer verticalement, et surtout ses deux angles inférieurs sont trop fragiles, le verre



ne s'étend pas en ces deux points lors du moulage de la pièce.

Nous croyons avoir paré à ces inconvénients et avoir acquis de nouveaux avantages sur la boîte de Pétri et la boîte triangulaire, avec le modèle de tube plat représenté par la figure 3.

Ces tubes ont une longueur de 20 centimètres, une ouverture de 20 millimètres facile à capuchonner, la section en constitue un des principaux avantages; cette section représente un triangle isocèle à sommet arrondi (fig. 2). Une longue cuvette

à fond plat, où le milieu s'étale en une couche d'épaisseur uniforme, occupe toute la longueur du tube. Sur la face opposée au voisinage des extrémités du tube sont deux reliefs plans (fig. 3) permettant de placer à l'étuve l'appareil dès que le milieu vient d'y être étalé et ensemencé; dans cette position le milieu ne peut glisser puisqu'il est coincé dans son mouvement de descente par l'obliquité des deux côtés du triangle (fig. 2 *a*); cette disposition était déjà utilisée par C. Jouan pour les grandes boîtes qu'il a fait fabriquer en modification des boîtes de Roux. La limite supérieure du relief inférieur sert de jauge pour la quantité de milieu à répartir dans chaque tube; cette hauteur représente le volume nécessaire pour remplir la cuvette plane.

Nous avons fait fabriquer trois modèles de ces tubes, un petit dont la surface de milieu est de 17 centimètres carrés; le moyen, le plus recommandable pour une séparation, 46 centimètres carrés; le grand modèle de 64 centimètres carrés. J'estime cependant que cette question de surface n'a pas l'importance capitale que lui accordent la plupart des bactériologistes; il arrive que deux travailleurs utilisant des matériaux identiques, l'un obtient des séparations très nettes sur des surfaces de 17 centimètres alors que l'autre couvre de colonies confluentes une surface de 64 centimètres.

La technique de l'ensemencement assure seule le bon résultat d'une séparation. Voici celle qui nous sert depuis de nombreuses années avec les tubes à essais de 170×17 et qui, appliquée aux tubes plats, nous donne des résultats parfaits.

Remplir l'anse de platine du produit dont on veut séparer les microbes (matières fécales, pus, etc.), la porter au fond du tube, l'essuyer avec insistance à ce niveau sur une étendue d'environ 2 centimètres du milieu nutritif (fig. 4 *a*), puis soulever l'anse, la reporter à quelques millimètres en deçà (fig. 4 *b*) pour tracer, par un mouvement lent jusqu'à l'orifice du tube, une ligne ininterrompue de zigzags très rapprochés sans craindre de repasser deux ou trois fois sur la même ligne (fig. 3 *c*). Par ce procédé la plus grande partie du produit bactérifère est déposée sur la portion inférieure du milieu et le reste de la surface est ensemencé de telle sorte que les divers germes donnent des colonies séparées les unes des

autres. Après seize à dix-huit heures d'étuve à 37°, les premières stries présentent des colonies confluentes, mais les stries suivantes donnent des colonies isolées.

Il est *inutile de diluer* le produit bactérifère que l'on doit examiner; du reste, la dilution est une méthode de choix qui permet d'isoler une espèce déterminée de toute autre qui l'accompagne, ce qui va à l'encontre de la séparation bactérienne qui, elle, tend à faire connaître non seulement tous les germes présents, mais encore leur proportion respective.

Dans ce tube plat la technique de la séparation s'opére à l'abri des contaminations venant de l'extérieur : la visibilité des colonies développées est parfaite à l'œil nu, à la loupe ou au microscope; le tube est facile à transporter; il n'est pas encombrant dans l'étuve; son prix est trois fois moindre que celui d'une boîte de Pétri de même surface; la quantité de milieu est moindre d'un quart que celle employée dans une boîte de Pétri. Le grand avantage de ce tube est de pouvoir conserver les milieux nutritifs le plus longtemps possible à l'abri des souillures et de la dessiccation par suite du capuchonnage.

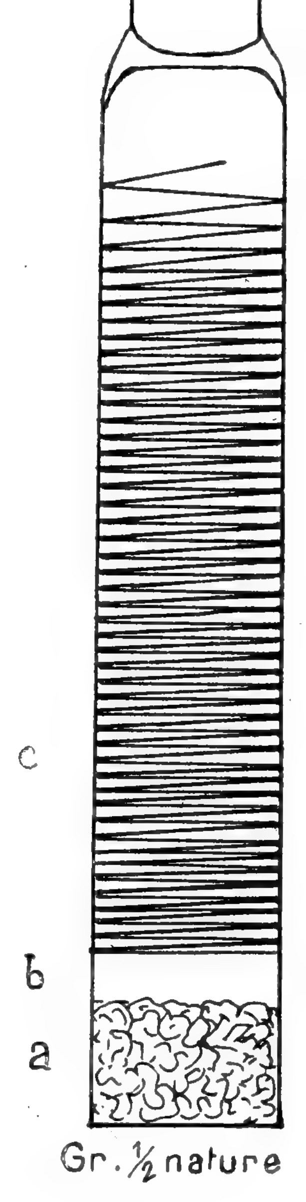


FIGURE 4.

La surface du milieu est commode à ensemencer; j'ai vu des bactériologistes peu expérimentés, ayant à rechercher le méningocoque dans le mucus rhino-pharyngé, employer ces tubes pour la première fois et obtenir plus de 80 p. 100 de leurs tubes (sur 350) avec des colonies isolées; les milieux avaient été ensemencés avec le tampon de coton de l'attouchement.

Enfin par la solidité de leurs parois ces tubes supportent le vide, ils se prêtent donc parfaitement aux cultures sur milieux solides des anaérobies les plus stricts; il suffit pour cela de fermer l'ouverture au-dessus du tampon de coton avec un bouchon de caoutchouc percé d'un trou traversé par un tube de

verre à étranglement qui est scellé à la fin des opérations.

Tous les milieux solidifiables peuvent être employés dans ces tubes; une des applications les plus intéressantes est d'y coaguler le sérum pour la recherche du bacille diphtérique ; un seul de ces tubes est suffisant pour obtenir des colonies espacées en partant de la fausse membrane prélevée au moyen d'un tampon de coton.

DE L'IMPORTANCE DE LA VOIE RESPIRATOIRE DANS LA PRODUCTION DES ANTICORPS

par W. PFENNINGER (Zurich).

C'est au cours de ses recherches sur l'anaphylaxie que M. Besredka a, le premier, pratiqué les injections intra-trachéales, méthode à laquelle on n'avait pas l'habitude de recourir. Il a pu constater (1) que, comparée aux voies intra-péritonéale et intraveineuse, la voie respiratoire est aussi accessible sinon plus; les lapins et les cobayes supportent des doses considérables de sérum sans présenter le moindre trouble; que le choc anaphylactique peut être déclenché chez les cobayes aussi bien par la voie aérienne que par la veine ou par la voie cérébrale.

Le pouvoir d'absorption de la muqueuse respiratoire à l'égard des sérums thérapeutiques étant considérable, des lapins et des cobayes, qui reçoivent des sérums spécifiques par la trachée, sont rapidement immunisés et peuvent supporter dans la suite des doses 30, 50 fois mortelles de toxine diphtérique et tétanique.

Besredka (2) a, en outre, constaté que, lorsqu'il s'agit de toxines et de poisons solubles, qu'ils soient administrés par la voie intraveineuse ou par la voie respiratoire, leur action est la même et s'exerce avec la même promptitude. Vis-à-vis des éléments figurés, la couche épithéliale se comporte, par contre, comme un filtre qui, à mesure que la solubilisation se produit, leur permet de pénétrer lentement par la muqueuse.

Cet auteur a démontré qu'injecté par la voie trachéale, l'animal supporte une dose de virus paratyphique au moins 50 fois supérieure à celle que comporte sa résistance normale; mais qu'une injection préalable par la trachée de 1/2 cent.

(1) Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 51.
(2) Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 361.

cube d'une solution de bile de bœuf au 1/20, peut renverser la barrière, opposée normalement par la muqueuse aux virus, le paratyphique B, par exemple; la résistance d'un animal ainsi préparé est diminuée au moins de cinq fois à l'égard de ce virus.

Besredka a réussi, en plus, à créer l'immunité locale de l'appareil respiratoire : choisissant le bacille diphtérique qui ne donne lieu ni à la production d'anticorps, ni à la production d'une immunité active, il est arrivé à protéger le cobaye contre la dose mortelle dans la trachée en le vaccinant par cette voie.

La voie aérienne est surtout avantageuse quand il s'agit d'établir une production abondante d'anticorps. Besredka a démontré notamment le fait très important que, par l'injection intra trachéale de l'antigène tuberculeux à l'œuf, on arrive facilement à produire une quantité abondante et très durable d'anticorps, décelables par la réaction de fixation de Bordet-Gengou.

Les questions qui se posèrent à la suite de ces recherches de Besredka étaient les suivantes :

1° Est-il possible de produire des anticorps, en général, en injectant de l'antigène dans la trachée ?

2° Quel degré de susceptibilité présente la voie respiratoire à l'égard des antigènes déterminés ? Est-il possible de produire des anticorps en quantité suffisante ? Comment se comporte à cet égard la voie trachéale comparativement à la voie sanguine ou péritonéale ?

3° Comment les animaux injectés par la voie aérienne se comportent-ils au point de vue de l'immunité acquise, active ou passive, comparativement à ceux injectés par la veine ou par le péritoine ?

Les recherches suivantes ont pour but de répondre à ces questions.

* * *

Avant d'exposer nos expériences, il nous paraît utile de donner un aperçu sur le pouvoir de résorption de la muqueuse respiratoire. Cette muqueuse, très étendue, très fine et très

vasculaire, absorbe, en général, avec une extrême activité; elle tient sous ce rapport le premier rang parmi les surfaces libres de l'organisme. Elle est le lieu d'élection pour l'absorption des substances volatiles, en général; elle montre la même disposition à l'égard des substances liquides ou solubles, comme le prouvent maintes observations faites sur les animaux.

Goodwin, Ségalas, Mayer (1), ont constaté que l'eau, injectée dans la trachée du chien et du lapin, disparaît presque instantanément par absorption. Gohier et ses élèves ont pu introduire de 30 à 40 litres d'eau dans la trachée du cheval avant de provoquer la mort; à l'autopsie, pratiquée immédiatement après, ils ont pu constater que tout le liquide avait été absorbé. Colin (2) a fait couler 18 litres d'eau pendant trois heures dans la trachée d'un cheval sans le gêner considérablement. Le pouvoir de résorption de la muqueuse respiratoire à l'égard des médicaments, sous forme de gaz, est bien connue et on l'utilise dans la pratique pour provoquer l'anesthésie. Les sels solubles s'absorbent aussi très facilement; les sels de strychnine déterminent chez le chien la mort en cinq ou six minutes après l'injection intratrachéale (Mayer). Colin a retrouvé ce sel dans le sang de la veine jugulaire d'un cheval, quatre minutes après l'injection intratrachéale. Le curare, non absorbé dans l'intestin, passe facilement par la muqueuse respiratoire.

Tout récemment, Guieysse-Pellissier (3) a étudié l'absorption de l'huile d'olive dans les poumons du lapin et du chien; il a pu démontrer qu'elle s'y effectue par les cellules épithéliales alvéolaires.

La technique des injections intratrachéales employée dans nos expériences sur le lapin et le cobaye est très simple. On fixe les animaux sur la table d'opération. Après avoir nettoyé le champ d'opération, on pratique au niveau de la peau une incision médiane qui découvre la trachée; cette opération, très facile chez le lapin, l'est un peu moins chez le cobaye, surtout quand il est gras. On fixe la trachée avec une pince et on enfonce la pointe de la canule entre deux anneaux de cartilage. Il faut avoir soin d'injecter très lentement, sinon, une partie du liquide peut être rejetée par la toux.

L'opération terminée, on ferme la plaie par une agrafe de Michel; la plaie guérit sans aucune réaction dans l'intervalle entre deux injections.

Les cobayes supportent facilement jusqu'à 4 cent. cubes de liquide par injection, les lapins jusqu'à 10 cent. cubes; nous n'avons jamais observé d'accidents au cours de ces injections.

Pour les recherches que nous allons exposer, on a eu soin de comparer la production d'anticorps chez les animaux injectés par la trachée avec les anticorps des animaux injectés dans les veines ou dans le péritoine.

Nos recherches portent sur les agglutinines, les précipitines, les hémolysines, les bactériolysines, les bactéricidines et sur l'immunité active et passive.

(1) et (2) Cités d'après Colin : *Traité de physiologie comparée des animaux*, 2 Paris 1888.

(3) Résumés des communications et des démonstrations du Congrès de Physiologie. Paris, 16, 20 juillet 1920.

A. — ANTICORPS

I. — Agglutinines.

Il a été employé pour la production de ces anticorps une culture de bacille paratyphique B avec laquelle on a inoculé quatre lapins, deux dans les veines et deux par la trachée, à intervalles de sept jours. (Voir pour les détails le tableau I). L'examen des sérums était pratiqué six jours après la première et la deuxième injection, et quatre jours après la troisième.

Tableau I. — **B. paratyphique B.**

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des bacilles	1re injection	2e injection	3e injection	OBSERVATIONS
82 A	gr. 2.370	Intraveineux.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	5-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	»	Succombe le 9-10/V. Perte de poids de 420 gr.
83 A	2.270	Intraveineux.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	»	Succombe le 8-V. Perte de poids 635 gr.
84 A	2.030	Intratrachéal.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	13-V, 10 h. 1/10 de culture vivante.	Poids le 15-VI 2.480 gr.
99 A	1.570	Intratrachéal.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6 V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	13-V, 10 h. 1/20 de culture vivante.	Poids le 15-VI 1.990 gr.

Le *lapin* n° 82, pesant 2.370 grammes, inoculé par la veine, montre, six jours après la première inoculation, un titre de 1/800; quatre jours après la deuxième injonction, un titre de 1/3.200; il meurt, après avoir perdu un sixième environ de son poids initial. A l'autopsie, on ne trouve que de l'œdème des poumons: il a dû succomber à l'infection.

Le *lapin* n° 83, pesant 2.270 grammes, inoculé par la veine, tombe aussitôt malade. Trois jours après la première inoculation, il présente un titre de 1/400; cinq jours après, un titre de 1/4.800; deux jours après la deuxième inoculation, peu avant sa mort, il atteint un titre de 1/19.200. Le résultat de l'autopsie est négatif. En sept jours, le poids de l'animal a diminué de 635 grammes.

Le *lapin* n° 84, d'un poids de 2.030 grammes, est inoculé par la trachée; six jours après la première inoculation, le titre est de 1/800; quatre jours après la deuxième, il est de 1/8.000; quatre jours après la troisième, le pouvoir agglutinant est prononcé à la dilution de 1/9.600; le titre le plus haut 1/19.200 est atteint onze jours après la troisième inoculation; il tombe à 1/8.000, puis à 1/6.000, pour arriver, après quatorze jours, à 1/4.800.

Pendant toute la durée de l'expérience l'animal s'est bien porté; son poids a augmenté, en quarante jours, de 290 grammes.

Le *lapin n°* 99, pesant 1570 grammes, inoculé dans la trachée, présente un titre de 1/40 quatre jours après la première inoculation; 1/2.400 quatre jours

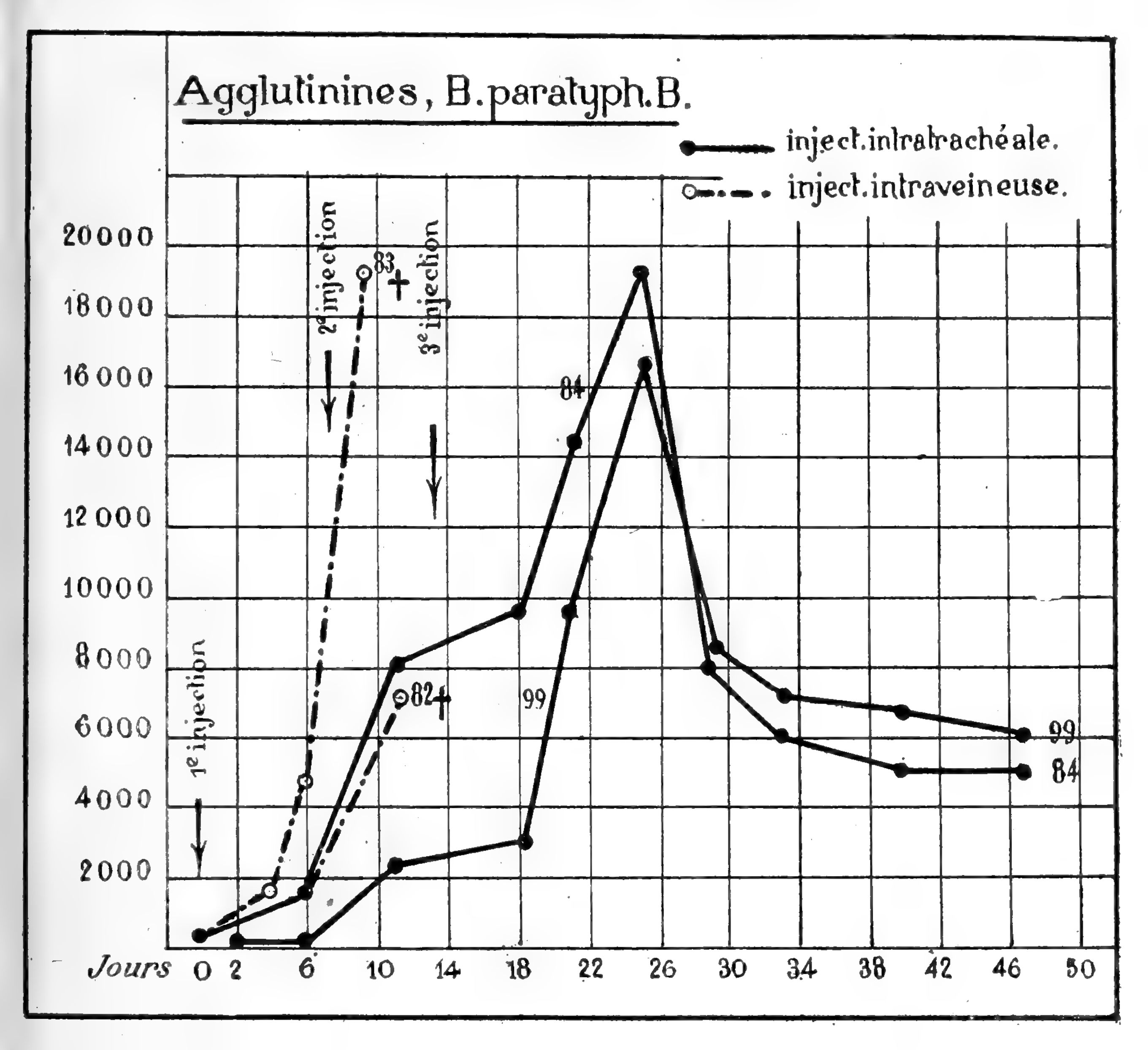
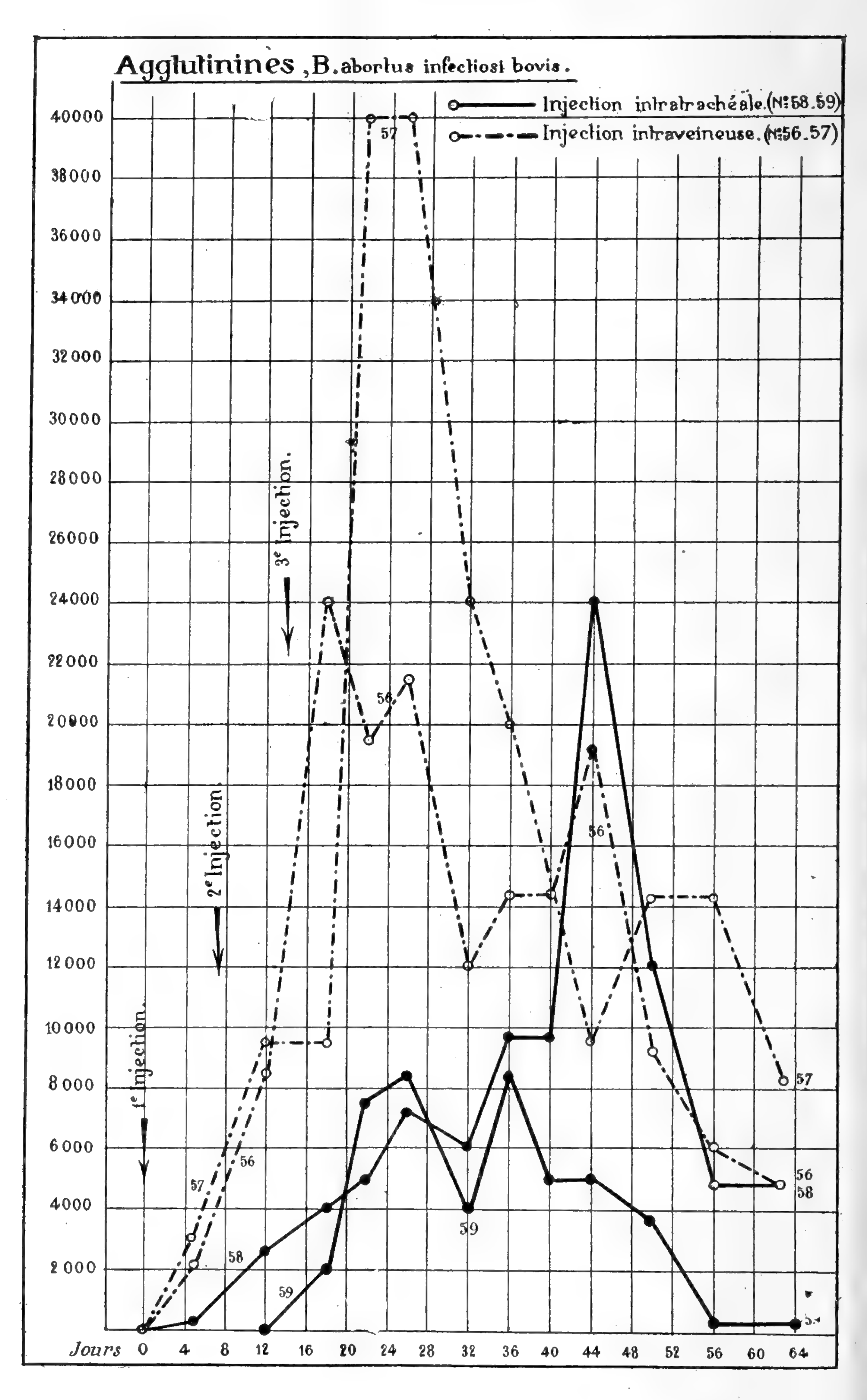


FIGURE 1.

après la deuxième et, quatre jours après la troisième, un titre de 1/3.200. Celui-ci s'élève ensuite et, comme celui du n° 84, atteint son maximum de 1/14.400, onze jours après la dernière inoculation. A partir de ce moment, le pouvoir agglutinant baisse peu à peu; au bout de quatorze jours le titre est de 1/7.200.

Pendant toute la durée de l'expérience, l'animal s'est bien porté; son poids a augmenté de 210 grammes.

Cette série, dont les résultats sont graphiquement consignés dans la figure 1, montre jusqu'à l'évidence que les mêmes doses



Agglutinines, B. abortus infectiosi bovis.
Injection intratrachéale. (N° 58.59)
Injection intraveineuse. (N° 56.57)
40000
38000
36000
34000
32000
30000
28000
26000
24000
22000
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
1e Injection.
2e Injection.
3e Injection.
57
56
58
59
Jours 0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64

FIGURE 2.

de virus paratyphiques B sont beaucoup mieux tolérées par la voie respiratoire que par la voie sânguine : la dose de 1/20 de culture vivante qui, par la voie veineuse, est à peu près la dose mortelle, est supportée sans le moindre inconvénient, lorsqu'elle est introduite par la voie trachéale. Cette tolérance de la voie aérienne pourra être d'une importance indéniable dans le cas où l'on aura besoin d'injecter des cultures vivantes pour produire des anticorps en grande abondance. Quant aux agglutinines obtenues par des injections trachéales, leur titre ne cède pas à celui que l'on obtient par la veine avec les mêmes doses d'antigène.

Il est un microbe qui donne, en général, des titres agglutinatifs très élevés et qui, pour cette raison, convenait particulièrement à nos expériences : c'est le bacille de l'avortement contagieux des bovidés (bacille de Bang). Nous disposions d'une culture de Belfanti, très peu virulente pour les lapins, possédant un pouvoir agglutinogène très considérable.

Cette culture, âgée de vingt-quatre heures, fut inoculée, à doses égales, à deux lapins par la veine, puis à deux autres par la trachée. Les injections, en trois séries, de 1/20, 1/10 et 1/5 d'une culture vivante, étaient pratiquées à sept jours d'intervalle (tableau II). L'examen du pouvoir agglutinant des sérums fut effectué cinq jours après les première et deuxième inoculations, quatre jours après la troisième, et ensuite, à intervalles de quatre ou six jours. La lecture des tubes était faite après un séjour de douze heures à l'étuve et de dix-huit heures à la température du laboratoire, l'agglutination se produisant très lentement avec ce microbe.

Le *lapin n°* 56 pesant 2.350 grammes, injecté par la veine, présente cinq jours après la première inoculation, un titre de 1/2.000 ; cinq jours après la deuxième, un titre de 1/8.400. Quatre jours après la troisième injection, le titre atteint son maximum avec 1/24.000, puis il va en déclinant, non sans accuser plusieurs relèvements passagers. Quarante-deux jours après la dernière inoculation, il est à 1/6.000.

Chez le *lapin n°* 57, pesant 2.320 grammes, injecté par la veine, le titre est de 1/2.800 cinq jours après la première injection ; de 1/8.600 cinq jours après la deuxième, et quatre jours après la troisième. Mais, huit jours après la troisième, il atteint son maximum 1/39.800. Il commence à décroître le douzième jour, et le dix-huitième il retombe à 1/24.000 ; le vingt-quatrième jour, il est encore à 1/14.000.

Le *lapin n°* 58, pesant 2.330 grammes, et le *n°* 59, pesant 2.600 grammes, reçoivent à trois reprises et en même temps que les nos 56 et 57, des injections par la trachée. Le bacille de Bang, administré par la voie respiratoire, paraît n'être pas assez offensif pour provoquer une abondante production d'agglutinines ; douze jours après la troisième inoculation, alors que les deux animaux injectés par la veine ont atteint un titre maximum de 1/39.800, et de 1/24.000,

le pouvoir agglutinant des nos 58 et 59 ne présente qu'un titre de 1/7.200 et de 1/8.400. La dose massive d'une demi-culture vivante, injectée ensuite à ces deux animaux, provoque chez le n° 58, une augmentation considérable du titre, équivalent au titre maximum du lapin n° 56, tandis que le n° 59 ne réagit que faiblement.

Tableau II. — **Bacille de l'avortement.**

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des bacilles	1re injection	2e injection	3e injection	4e injection	OBSERVATIONS
56	2.350	Intraveineux.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	»	Poids le 16-VIII 2.550 gr.
57	2.320	Intraveineux.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	»	Poids le 16-VIII 2.820 gr.
58	2.330	Intratrachéal.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VIII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	20-VIII, 5 h. 1/2 de culture vivante.	Poids le 16-VIII 2.580 gr.
59	2.600	Intratrachéal.	21-VI, 12 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VIII, 3 h 1/5 de culture vivante.	20-VII, 5 h. 1/3 de culture vivante.	Poids le 16-VIII 2.920 gr.

Il résulte de ce qui précède que le bacille de Bang, peu offensif, injecté par la trachée, ne saurait déterminer une aussi abondante production d'agglutinines que lorsqu'il est injecté par la voie intraveineuse ; cependant, par les injections trachéales massives, on peut atteindre un titre égal à celui qu'on obtient avec des doses moyennes intraveineuses.

II. — Précipitines.

Dans cette série d'expériences, nous avons choisi le sérum normal de cheval comme antigène.

Le *lapin n°* 7, pesant 2.030 grammes, injecté par la veine, présente un titre de 1/200 six jours après la première injection, de 1/400 sept jours après la deuxième et de 1/2.000 quatre jours après la troisième. Seize jours après

cette dernière injection, il atteint son maximum, soit 1/7.200 ; à partir de là, il baisse d'abord rapidement, puis plus lentement, et cinquante-cinq jours après la dernière injection d'antigène, il est encore à 1/800. Au cours de l'expérience, c'est-à-dire en l'espace de soixante-dix jours, le poids de l'animal a augmenté de 820 grammes.

Le *lapin n°* 8, pesant 1.970 grammes, injecté par la veine, présente un titre de 1/20 six jours après la première injection, de 1/200 sept jours après la deuxième, et de 1/1.000 quatre jours après la troisième ; huit jours plus tard, il monte à 1/2.000 et retombe peu de temps après ; seize jours plus tard, il

TABLEAU III. — **Sérum du cheval normal.**

LAPIN N°	POIDS initial	MODE D'EMPLOI du sérum	1re injection	2e injection	3e injection
7	2.030	Intraveineux. . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
8	1.970	Intraveineux. . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
11	2.150	Intratrachéal. . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
23	1.820	Intratrachéal. . Sérum liquide.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 3 h. 3 c. c.	30/V, 9 h. 3 c. c.
12	1.880	Intratrachéal. . Sér. sirupeux .	8/V, 5 h. 0 gr. 3	15/V, 3 h. 0 gr. 3	23/V, 9 h. 0 gr. 3
13	1.970	Intratrachéal. . Sér. sirupeux .	8/V, 5 h. 0 gr. 3	15/V, 3 h. 0 gr. 3	23/V, 9 h. 0 gr. 3

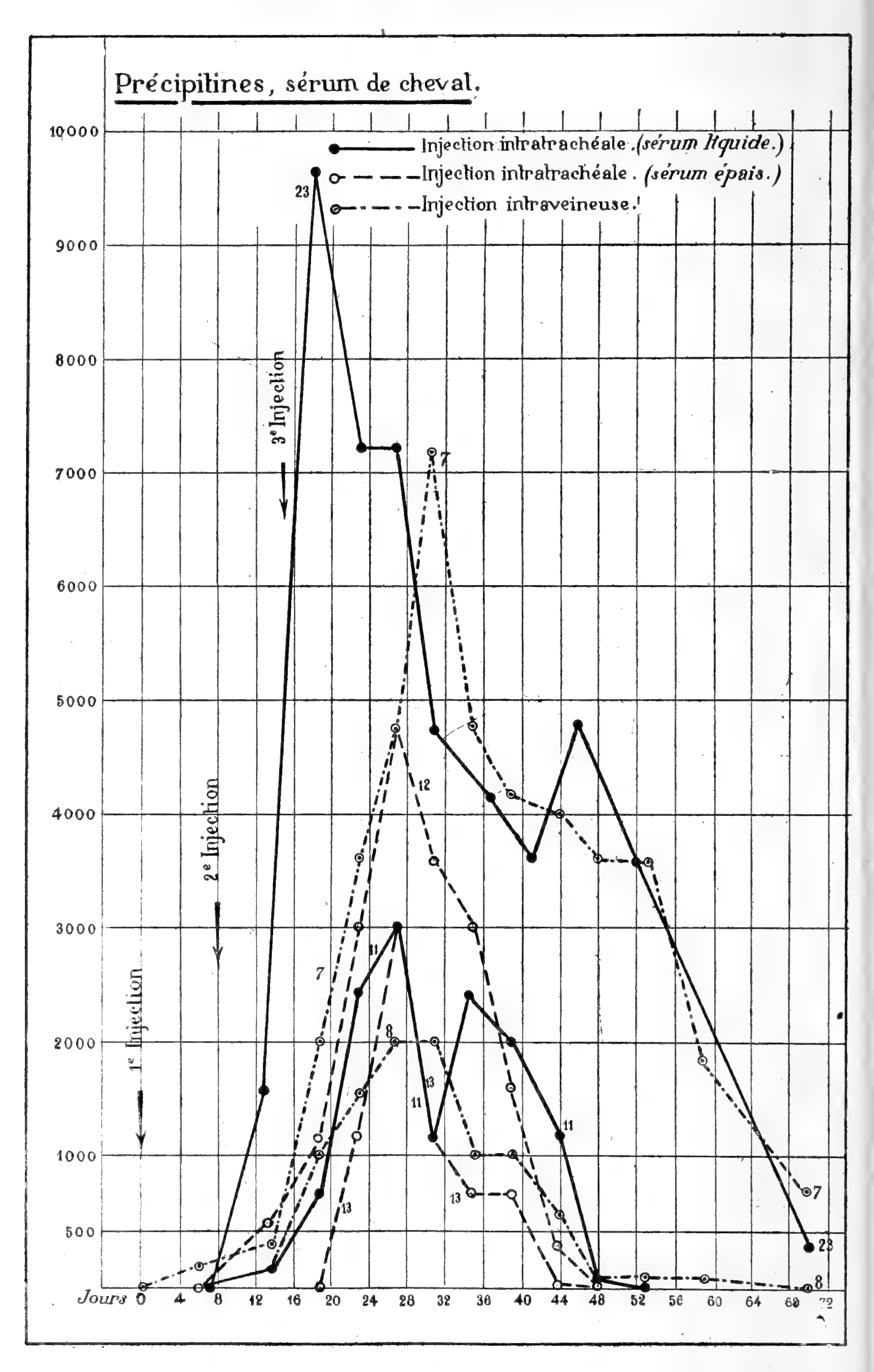
est encore à 1/100. Le poids de l'animal a augmenté de 250 grammes au cours de l'expérience.

Le *lapin n°* 11, pesant 2.150 grammes, inoculé par la trachée, ne présente aucun pouvoir précipitant six jours après la première injection; sept jours après la deuxième injection, le titre est de 1/200; quatre jours après la troisième, il est de 1/800; le douzième jour après la troisième injection, il est arrivé à son maximum de 1/2.400. Le poids du lapin a augmenté de 160 grammes.

Le *lapin n°* 23, pesant 1.820 grammes, inoculé par la trachée, présente une réaction négative sept jours après la première inoculation ; six jours après la deuxième, le titre est de 1/1.600 et déjà trois jours après la troisième, il atteint son maximum, soit 1/9.600, puis il retombe en cinq jours à 1/7.200. Le poids de l'animal avait augmenté de 600 grammes en soixante-dix jours.

Les deux derniers animaux de cette série ont été injectés avec du sérum sirupeux par la trachée, 0 gr. 3 par injection.

Chez le *lapin n°* 12, pesant 1.880 grammes, le sérum présente, six jours après la première administration, une réaction négative ; six jours après la



Précipitines, sérum de cheval.
Injection intratrachéale. (sérum liquide.)
Injection intratrachéale. (sérum épais.)
Injection intraveineuse.
1e Injection
2e Injection
3e Injection
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
500
Jours 0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72

FIGURE 3.

deuxième injection, un titre de 1/600 ; quatre jours après la troisième, un titre de 1/1.200 ; huit jours plus tard, il atteint son maximum, soit 1/4.800 ; puis en quatre jours, il retombe à 1/3.600 ; trente-trois jours après la troisième injection, le pouvoir précipitant a disparu. Le poids de l'animal a augmenté pendant les premiers vingt-quatre jours ; puis, par suite d'une maladie spontanée (septicémie), il a diminué en huit jours de 300 grammes.

Chez le *lapin n°* 13, pesant 1.970 grammes, la marche de la courbe des précipitines est un peu singulière : l'apparition des précipitines est notamment fort retardée. La réaction demeure négative, non seulement six jours après la première, et sept jours après la deuxième injection, mais encore quatre jours après la dernière ; c'est seulement le huitième jour qu'elle devient manifeste à la dilution de 1/1.200 ; quatre jours plus tard, le titre présente son maximum, soit 1/3.000. Au cours de l'expérience, le poids de l'animal a augmenté de 280 grammes.

D'une façon générale, cette série d'expériences montre que, abstraction faite des écarts individuels, l'injection intratrachéale de l'antigène, pratiquée en vue d'obtenir des précipitines, produit des résultats au moins équivalents, sinon supérieurs, à ceux que donne l'injection intraveineuse.

Le titre moyen des animaux traités avec du sérum liquide par la trachée est, en effet, plus élevé que le titre fourni par les injections intraveineuses (lapins n°s 7 et 8).

III. — Hémolysines.

Les expériences relatives à la production des hémolysines furent faites également sur une série de quatre lapins : deux ont reçu les injections par la veine, deux autres par la trachée.

Le *lapin* n° 1, pesant 2.030 grammes, injecté par la veine, présente un titre de 1/50 quatre jours après la première injection, de 1/200 six jours après la deuxième ; six jours après la troisième, le sérum hémolyse à 1/800 ; neuf jours après la dernière injection, il présente le plus haut titre, c'est-à-dire 1/1.200 ; puis, il retombe en dix jours à 1/400. Le poids de l'animal a augmenté de 100 grammes en trente et un jours.

Le *lapin* n° 2, pesant 2.045 grammes, inoculé par la veine, présente un titre de 1/50 après la première injection et un de 1/600 six jours après la deuxième ; l'animal meurt dans la suite. A l'autopsie, on constate au niveau de la trachée une hémorragie et des noyaux de coccidiose dans le foie.

Le *lapin* n° 3, pesant 2.150 grammes, est inoculé par la trachée ; quatre jours après, son sérum hémolyse à 1/10 ; six jours après la deuxième inoculation, à 1/75, et six jours après la troisième, à 1/400 ; neuf jours après la troisième injection, la courbe des hémolysines a atteint son maximum avec 1/800 ; elle retombe ensuite en dix jours à 1/100. Le poids de l'animal, souffrant de la maladie du nez, diminue de 270 grammes en trente et un jours.

Le *lapin* n° 4, pesant 2.250 grammes, inoculé par la trachée, présente quatre jours après la première injection un titre hémolytique de 1/50; six jours après la deuxième injection, il est à 1/100; quatre jours après la troisième

TABLEAU IV. — **Globules rouges de mouton.**

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des globules	1re injection	2e injection	3e injection	OBSERVATIONS
1	gr. 2.030	Intraveineux.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Augmentation de poids : 100 gr.
2	2.045	Intraveineux.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	»	Meurt le 19-20/V. A l'autopsie : trachéite, hémorragie, coccidiose du foie.
3	2.150	Intra-trachéal.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Perte de poids : 270 gr. (animal a la maladie du nez).
4	2.250	Intra-trachéal.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Augmentation de poids : 250 gr.

injection, à 1/1.600; neuf jours après la dernière injection, il atteint son maximum : 1/2.000, puis en dix jours le titre retombe rapidement à 1/200. L'animal s'est bien porté pendant la durée de l'expérience; son poids a augmenté de 250 grammes en trente et un jours.

Les courbes des hémolysines montrent que, pour la production de ces anticorps, l'administration de l'antigène par la trachée est au moins aussi favorable que l'injection intraveineuse. Le maximum de la production est atteint le neuvième jour qui suit la troisième injection. Comme il s'agit ici d'éléments figurés et que la résorption s'effectue plus lentement que par la veine, on court moins de danger de provoquer des troubles liés à introduction d'albumine hétérogène par la voie sanguine (fig. 4).

IV. — Bactériolysines et bactéricidines.

Au point de vue spécial auquel nous nous sommes placé, il était intéressant d'examiner le pouvoir bactériolytique des sérums obtenus par la préparation intratrachéale, comparati-

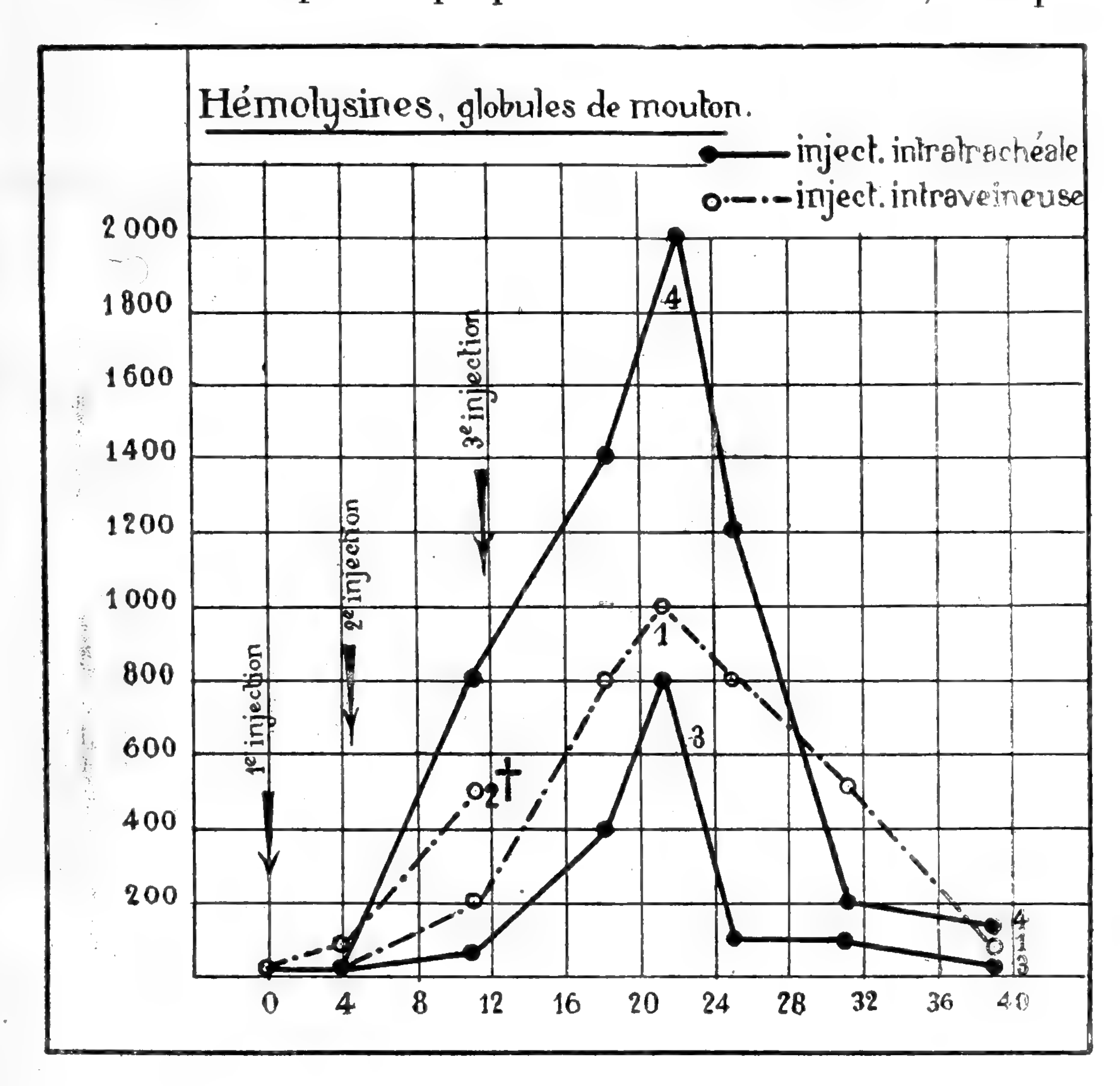


FIGURE 4.

vement avec celui des sérums obtenus par une des méthodes ordinaires.

Pour ces recherches nous avons choisi le vibrion cholérique.

Quatre cobayes ont été inoculés, en trois fois, à sept jours d'intervalles, avec des vibrions morts provenant d'une culture de vingt-quatre heures; deux des animaux (les nos 45 et 46) ont été vaccinés par le péritoine, les deux autres (les nos 47 et 48) ont reçu par la trachée les mêmes doses, soit 1/20, 1/10 et 1/5 de culture morte (tableau V). Voici les résultats de l'examen, en goutte suspendue, cinq jours après la troisième injection des animaux.

Cobaye no 45. — Au bout de vingt minutes, beaucoup d'éléments sphériques, peu mobiles, très peu de formes indemnes.

Cobaye no 46. — Très peu de bâtonnets incurvés, la plupart immobiles et en granules peu réfringents.

Cobaye n° 47. — Granules immobiles ; très peu de virgules.

Cobaye n° 48. — Beaucoup de granules ; formes de virgules très rares.

Cobaye normal. — Au bout de trente minutes, formes de virgules bien nettes, douées de mouvements vifs ; pas de formes dégénérées ; au bout d'une heure, même constatation.

L'exsudat péritonéal fut examiné de nouveau huit jours après la troisième vaccination (tableau VI).

Afin d'augmenter encore le pouvoir bactériolytique de sérums, on inocule les cobayes de cette série, dix jours après la troisième vaccination, avec 1/20

TABLEAU V. — **Vibrion cholérique.**

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des microbes	1re injection	2e injection	3e injection	OBSERVATIONS
45	gr. 540	Intrapéritonéal.	17-VI, 5 h. 1/10 de culture morte (1 h. à 60°).	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte (1 h. à 60°).	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte (1 h. à 60°).	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
46	400	Intrapéritonéal.	17-VI, 5 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
47	500	Intratrachéal.	17-VI, 5 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
48	450	Intratrachéal.	17-VI, 3 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante

d'une culture vivante ; neuf jours après, on examine de nouveau l'exsudat péritonéal. Les résultats obtenus correspondent à ceux enregistrés ci-dessus. Nous nous bornons à donner le procès-verbal du dernier examen, pratiqué douze jours après l'inoculation.

(Dans l'expérience avec le sérum n° 47, on observe que, aux dilutions de 1/10 et 1/20, le pouvoir bactéricide est moins considérable qu'aux concentrations moins grandes. Ce phénoméne, décrit pour la première fois par Neisser et Wechsberg, est dû, d'après ces auteurs, à la déviation du complément déterminée par l'excès de sensibilisatrice [tableau IX]).

Le dosage du pouvoir bactéricide confirme les résultats constatés antérieurement. De plus, l'expérience montre que le sérum du cobaye n° 47 préparé par la trachée est, au point de vue du pouvoir bactéricide, 4 à 5 fois supérieur au sérum de l'animal injecté par le péritoine.

Tableau VI.

NUMÉRO du cobaye	GOUTTE SUSPENDUE	PRÉPARATION COLORÉE au bout d'une heure	CULTURE au bout de 3 heures
45	Au bout de 20 minutes, très peu de mobiles; pas de formes indemnes; après 3 heures, pas de formes mobiles.	Formes de virgules très rares; granules.	Environ 100.000.
46	Au bout de 20 minutes, aucun mouvement; granules nombreux, peu réfringents.	Eléments nombreux, ressemblant à des microcoques mal colorés, pâles.	Colonies isolées seulement.
47	Au bout de 20 minutes, aucun mouvement; granules très nombreux.	Granules mal colorés.	200.000 colonies.
48	Au bout de 20 minutes aucun mouvement; granules peu réfringents.	Formes de virgules très rares; débris irréguliers, mal colorés.	Environ 1.000.000 de colonies.
Cobaye normal	Au bout de 1 heure beaucoup de vibrions mobiles, d'aspect normal; même au bout de 3 heures, les vibrions ont gardé leurs formes de virgules et les mouvements oscillatoires.	Dans chaque champ visuel, plusieurs virgules colorés en rouge foncé.	Colonies ∞.

Tableau VII.

NUMÉRO du cobaye	GOUTTE SUSPENDUE	PRÉPARATION COLORÉE au bout d'une heure	CULTURE au bout de 3 heures
45	Granules arrondis, ternes, pas de formes bien définies.	Virgules en granules mal colorés; formes ressemblant à des bacilles diphtériques.	Le milieu est resté stérile.
46	Granules immobiles, pas de formes de virgule.	Granules arrondis pâles.	Id.
47	Point de mouvement; granules ternes, peu réfringents.	Pas de vibrions intacts; granules rouge clair.	Id.
48	Très peu de mouvement, beaucoup de granules.	Pas de vibrions indemnes, granules pâles.	Environ 100.000 colonies.
Cobaye normal	Peu de vibrions, mais bien mobiles, mouvement et aspect caractéristiques.	Beaucoup de vibrions en forme de virgules rouge foncé	Colonies ∞.

Tableau VIII. — **Sérum du cobaye n° 46 (injecté par le péritoine).**

ÉPROUVETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 24 h.
1	0,2 émuls. chol. + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	0
2	— — 0,5 sér. 1/10	3	0
3	— — 0,5 sér. 1/20	3	0
4	— — 0,5 sér. 1/50	3	0
5	— — 0,5 sér. 1/100	3	750
6	— — 0,5 sér. 1/200	3	∞
7	— — 0,5 sér. 1/500	3	∞
8	— — 0,5 sér. 1/5000	3	∞

Tableau IX. — **Sérum du cobaye n° 47 (injecté par la trachée).**

ÉPROUVETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 24 h.
1	0,2 émuls. chol. + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	0
2	— — 0,5 sér. 1/10	3	300
3	— — 0,5 sér. 1/20	3	très peu.
4	— — 0,5 sér. 1/50	3	0
5	— — 0,5 sér. 1/100	3	0
6	— — 0.5 sér. 1/200	3	env. 70
7	— — 0,5 sér. 1/500	3	env. 1.500
8	— — 0,5 sér. 1/1000	3	∞
9	— — 0,5 sér. 1/5000	3	∞

Tableau X. — **Sérum du cobaye témoin.**

ÉPROUVETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 20 h.
I	0,2 émuls. chol. + 0,7 Cl Na	tout de suite	env. 4.500
II	— + 0,7 Cl Na	3	∞
III	— + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	∞
IV	— — + 0,5 sér. 1/10	3	∞
V	— — + 0,5 sér. 1/50	3	∞

B. — L'IMMUNITÉ GÉNÉRALE

I. — L'immunité active.

Pour se rendre compte de la valeur d'une méthode de vaccination, il n'est tel que mettre les animaux vaccinés à l'épreuve d'une dose ou plusieurs doses mortelles. C'est de cette façon qu'il a été procédé dans les expériences que nous allons décrire.

Dans la première série, nous avons pris les lapins nos 84 et 99, immunisés contre le virus paratyphique B et qui ont déjà servi dans notre expérience sur les agglutinines.

Le *lapin* no 84 reçoit en trois fois, à intervalles de 7 jours, des bacilles paratyphiques (1/20 de culture vivante; 1/20 de culture morte, 1/10 de culture vivante) par la voie trachéale. Vingt-neuf jours après la dernière inoculation, le lapin présente un titre agglutinant de 1/6.000; il reçoit par la veine 1/5 de culture vivante paratyphique de vingt heures, ce qui correspond à une dose trois fois mortelle. L'animal succombe 30 heures après. L'autopsie révèle un œdème pulmonaire, une trachéite hémorragique et une légère tuméfaction de la rate. La vaccination n'était donc pas suffisante pour conférer à l'animal une immunité vis-à-vis d'une dose trois fois mortelle.

Le *lapin* no 99, vacciné comme le no 84, reçoit, trente jours après la troisième inoculation, une injection intratrachéale de 1/5 de culture paratyphique. Douze jours après la quatrième, l'animal, dont le sérum agglutine à 1/20.000, est mis à l'épreuve; il reçoit par la veine 1/5 de culture vivante. Il résiste à cette dose et se rétablit.

Dans une autre série d'expériences, nous nous sommes adressé à des cobayes. Nous avons préalablement établi que la dose minima mortelle est inférieure à 1/100 de culture en injection intrapéritonéale.

Deux *cobayes* nos 14 et 33 furent vaccinés trois fois, l'un par le péritoine l'autre par la trachée; dix-sept jours après la dernière injection, tous deux furent soumis à l'épreuve.

Le tableau suivant indique les dates des injections :

TABLEAU XI.

COBAYE No	INJECTÉ par la voie	POIDS initial	1re injection	2e injection	3e injection	SOUMIS à l'épreuve
		gr.				
14	Péritonéale.	485	6-VII, 1/40 de culture morte.	13-VII, 1/100 de culture vivante.	30-VII, 1/40 de culture vivante.	6-VIII, 1/20 de culture vivante dans le péritoine.
33	Trachéale.	400				

La dose de 1/20 de culture, qui dépasse au moins de cinq fois la dose minima mortelle, fut bien supportée par les deux animaux et surtout par le cobaye n° 33, vacciné par la trachée. Pour mieux illustrer l'influence de la vaccination par les différentes voies sur l'état général des animaux et sur la solidité de l'immunité acquise, nous indiquons ci-dessous graphiquement les variations de leurs poids :

Il ressort de ces expériences que, chez l'animal traité par le péritoine, le poids subit une perte assez considérable après la

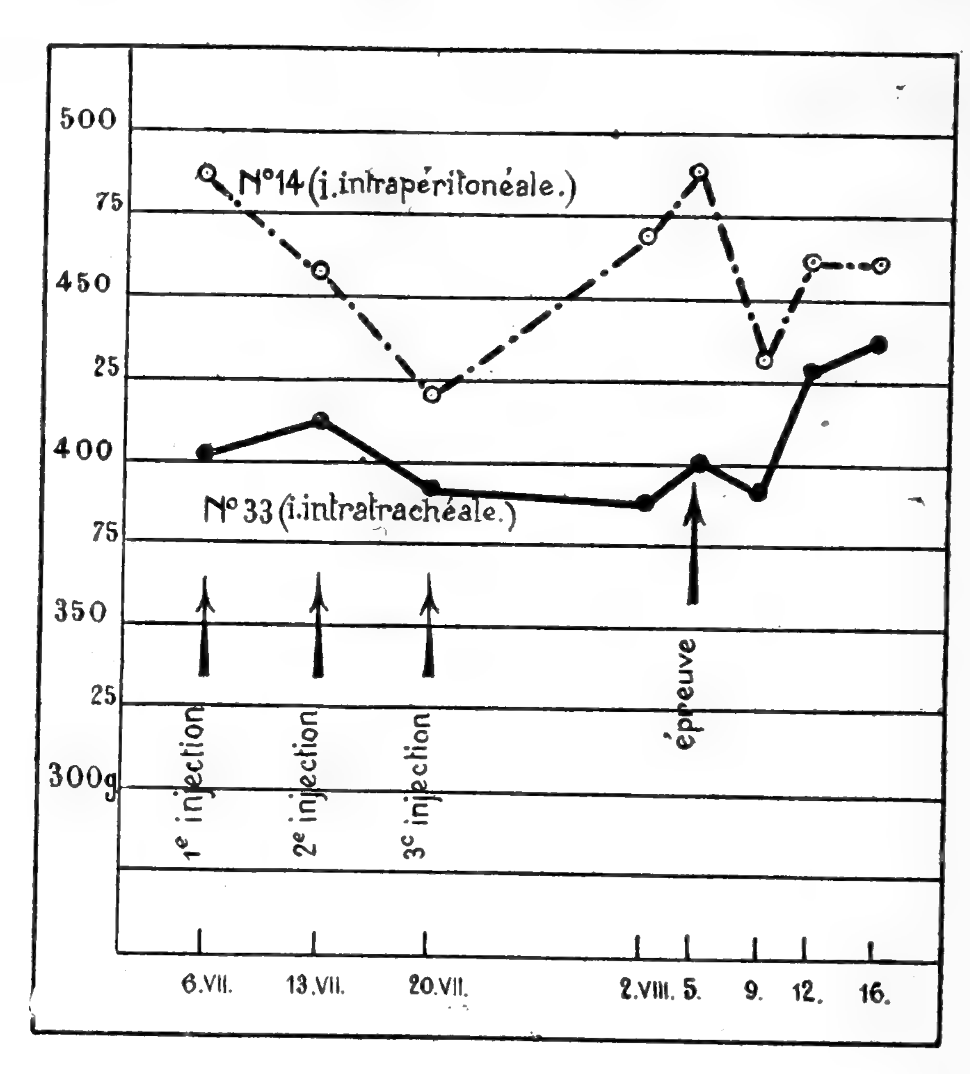


FIGURE 5.

première et la deuxième injection, alors que chez le cobaye vacciné par la trachée, le poids ne subit que des oscillations à peine marquées. L'immunité, conférée au cobaye n° 33 par la voie trachéale, était donc plus solide que celle produite chez le cobaye n° 14 par la voie péritonéale.

Cette différence a été au moins aussi manifeste dans l'expérience suivante. Trois cobayes ont reçu, à quatre reprises, des bacilles paratyphiques, deux par la voie péritonéale, le troisième par la trachée. Quinze jours après la dernière injection, on soumet à l'épreuve le cobaye vacciné par le péritoine (1/20 de culture vivante). Il supporte cette dose. Les deux autres ani-

maux reçoivent, vingt jours après la quatrième vaccination, 1/15 de culture paratyphique B.

Les détails des expériences sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XII.

COBAYE N°	POIDS initial	INJECTÉ par la voie	1re injection	2e injection	3e injection	4e injection	SOUMIS à l'épreuve
76	gr. 500	Péritonéale.	20-VI, 1/100 de culture morte.	6-VII, 1/20 de culture morte.	13-VII, 1/100 de culture vivante.	20-VII, 1/40 de culture vivante	4-VIII, 1/20 de culture vivante.
77	350	Péritonéale.					9-VIII, 1/15 de culture vivante par la voie péritonéale.
80	420	Trachéale.					

Le *cobaye* n° 76 tolère bien la dose de 1/20 de culture; mais la vaccination ultérieure est suivie d'une perte de poids considérable, perte qui s'accentue surtout après l'injection de la dose cinq fois mortelle.

Le *cobaye* n° 77 perd du poids au cours de la vaccination, surtout après la troisième injection; puis, ayant rattrapé son poids initial avant d'être soumis à l'épreuve, il perd de nouveau 20 grammes. Il paraît assez solidement vacciné contre la dose environ 8 fois mortelle.

Le *cobaye* n° 80, vacciné par la trachée, jouit pendant toute la durée de la vaccination d'une santé parfaite et d'un excellent état apparent, ainsi que le montre la courbe relative à son poids; ce n'est qu'après la troisième injection, à la première administration de bacilles vivants, qu'on remarque un léger abaissement de la courbe, qui, d'ailleurs, est de courte durée; dès la quatrième inoculation, le poids augmente assez rapidement, sans interruption, et même l'injection d'une dose 8 fois mortelle ne peut troubler l'ascension qui est plus rapide encore qu'avant l'épreuve.

L'immunité conférée par la voie aérienne a donc été très solide.

Pour déterminer la valeur de l'injection intratrachéale dans l'immunité active, nous avons eu recours à un autre germe, au vibrion cholérique. Nous avons utilisé les cobayes dont nous nous étions servis pour obtenir le sérum bactériolytique.

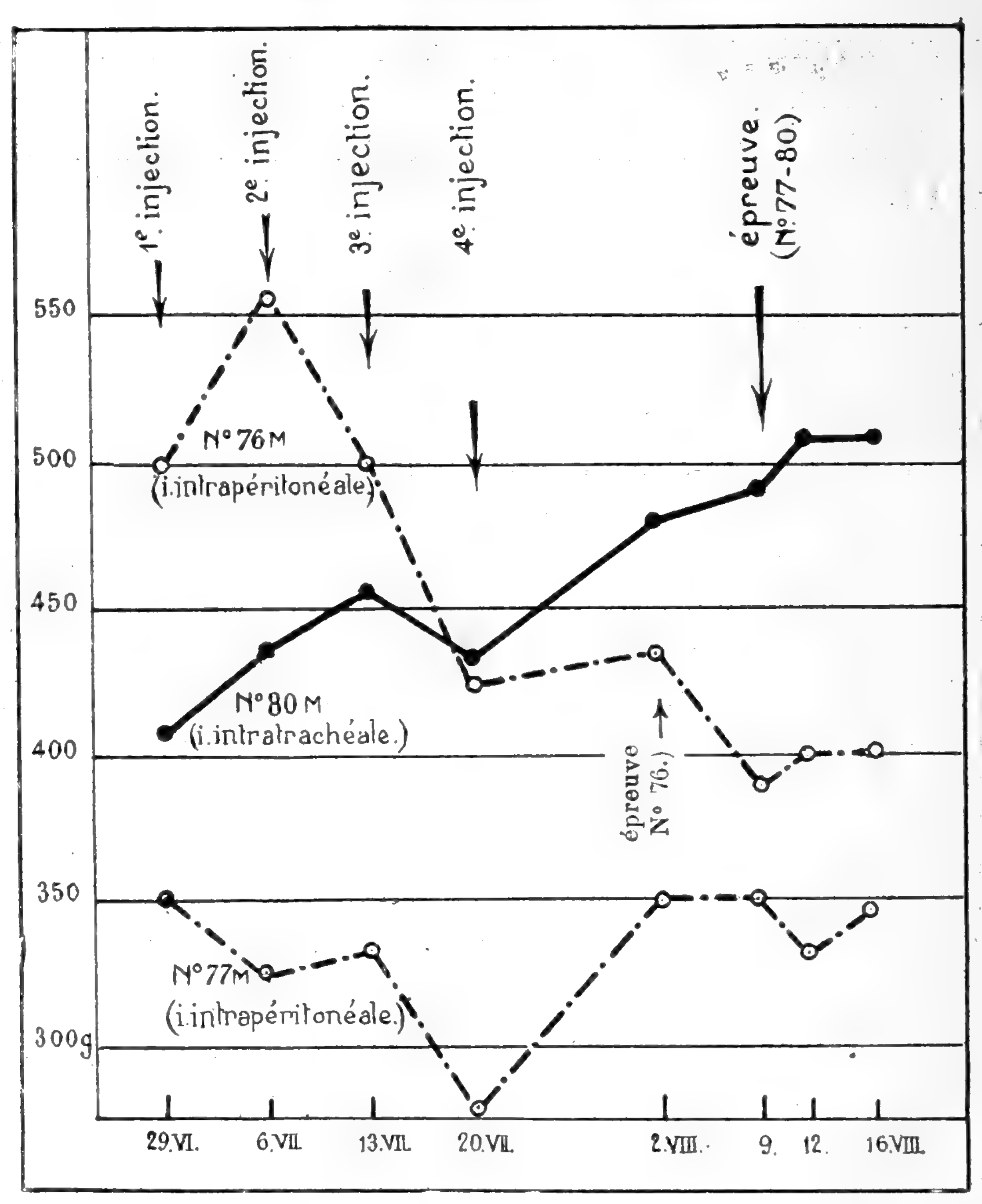


FIGURE 6.

Nous rappelons ci-dessous la préparation des animaux :

TABLEAU XIII.

COBAYE N°	POIDS initial	INJECTÉ par la voie	1re injection	2e injection	3e injection	4e injection	SOUMIS à l'épreuve
45	gr. 540	Périto-tonéale.	17-VI, 1/20 de culture de vibrion cholérique mort 1 h. à 60°.	24-VI, 1/10 de culture morte.	30-VI, 1/5 de culture morte.	10-VII, 1/20 de culture vivante.	4-VII, 1/20 de culture vivante.
46	400	Périto-néale.					6-VIII, 1/20 de culture vivante par voie périto-néale.
47	500	Trachéale.					

Il a été déterminé au préalable la virulence de notre culture de vibrions :

Le *cobaye* n° 20, pesant 350 grammes, reçoit, en injection péritonéale, 1/40 de culture sur gélose ; il succombe huit heures après.

Le *cobaye* n° 21, pesant 285 grammes, reçoit, en injection péritonéale, 1/100 de culture vivante ; il présente quelque malaise, mais se rétablit vite.

D'après ces expériences, la dose minima mortelle pour les cobayes est de 1/60 de culture vivante.

Le *cobaye* n° 45 reçoit, en injection péritonéale, vingt-quatre jours après la dernière inoculation, 1/20 de culture, soit une dose trois fois mortelle ; il supporte cette dose, non sans accuser une perte de poids considérable. Les deux autres cobayes, n°s 46 et 47, également soumis à l'épreuve, reçoivent la même dose de 1/20 de culture ; tous deux ont survécu.

Comme nous l'avons déjà vu pour le virus paratyphique, l'immunité de l'animal préparé par la trachée vis-à-vis du vibrion cholérique paraît donc au moins aussi solide que celle des cobayes préparés par la voie péritonéale.

II. — L'immunité passive.

Il a été démontré ailleurs (1) que la voie respiratoire se prête aisément à la transmission de l'immunité passive. Pour le vérifier de nouveau, nous avons eu recours aux sérums des cobayes n°s 46 et 47.

L'expérience se trouve résumée dans le tableau suivant :

TABLEAU XIV.

COBAYE N°	POIDS	INJECTÉ par la voie	SÉRUM anticholérique	INJECTION intrapéritonéale	OBSERVATIONS
I	255 gr.	Péritonéale.	12/VII, 4 h. 0 c.c. 3 du cobaye 46.	13/VIII, 10 h.	Mort 8 h. après. Autopsie : vaisseaux du péritoine injectés, épanchements.
II	190 gr.	Trachéale.	0 c.c. 3 du cobaye 46.	1/60 de culture cholérique vivante.	Survit. Poids augmenté le 16/VIII.
III	240 gr.	Péritonéale.	0 c.c. 3 du cobaye 47.	»	Survit. Poids augmenté le 16-VIII.
IV	220 gr.	Trachéale.	0 c.c. 3 du cobaye 47.	»	Survit. Poids augmenté le 11/VIII.

(1) BESREDKA. *Loc. cit.*

Il résulte de cette expérience que la valeur thérapeutique du sérum n° 47, préparé par la trachée, est supérieure à celle du sérum obtenu par la préparation intrapéritonéale, ce qui concorde avec le résultat de l'expérience sur le pouvoir bactéricide. De plus, il semble que l'administration intratrachéale du sérum est plus efficace que l'administration intrapéritonéale.

RÉSUMÉ

Au cours de ces expériences nous avons constaté les faits suivants :

1° Des lapins, immunisés par la voie aérienne avec des doses croissantes de virus paratyphique B, produisent des agglutinines en abondance. Au point de vue du moment d'apparition, de la quantité et du moment de disparition de ces anticorps, ces animaux ne le cèdent en rien à ceux préparés avec les mêmes doses par la voie sanguine. De plus, les virus sont bien mieux tolérés par la voie respiratoire, la dose mortelle du bacille paratyphique B étant par la voie aérienne environ dix fois supérieure à celle par la voie veineuse.

Le bacille de l'avortement contagieux du bétail (bacille de Bang), germe très peu offensif, administré à des lapins par la voie aérienne, produit des agglutinines en bien moindre quantité qu'en injection intraveineuse; par des injections répétées dans la trachée, on peut, d'ailleurs, arriver à produire à peu près la même quantité d'anticorps.

2° Au point de vue de la quantité et de la persistance des précipitines vis-à-vis du sérum de cheval, le lapin se comporte de même que l'injection soit faite par la voie trachéale ou par la voie veineuse. Au point de vue de la rapidité de leur apparition et l'intensité de la réaction, l'injection intratrachéale ne le cède en rien à l'injection intraveineuse; elle paraît même supérieure à cette dernière.

3° La voie respiratoire se prête également à la production d'hémolysines ; les mêmes doses d'antigène, qu'elles soient injectées par la trachée ou par la veine, produisent ces anticorps au moins aussi rapidement et aussi abondamment.

4° Les bactériolysines et bactéricidines contre le vibrion cholérique sont produites, chez le cobaye, plus facilement, c'est-à-dire en quantité plus grande par injection intratrachéale que par injection péritonéale. Le sérum anticholérique produit par l'injection intratrachéale est plus actif, quant à son pouvoir bactéricide et préventif, que celui fourni par l'injection intrapéritonéale.

5° Au moyen d'une injection intratrachéale de virus paratyphique B, il est possible de conférer à des lapins une immunité active leur permettant de résister à une dose trois fois mortelle.

Des recherches comparatives sur l'immunité acquise par les voies respiratoire et péritonéale, chez des cobayes, montrent que l'injection intratrachéale crée une immunité plus solide contre le virus paratyphique B, que l'injection intrapéritonéale; de plus, les injections intratrachéales sont mieux tolérées.

Des recherches comparatives sur des cobayes immunisés contre le vibrion cholérique ont donné le même résultat.

6° Le pouvoir protecteur du sérum anticholérique s'est montré supérieur en injection intratrachéale, qu'en injection péritonéale.

* * *

Quelles sont les conclusions pratiques qui se dégagent de nos expériences?

Pour obtenir des sérums agglutinants, on aura avantage à recourir à l'immunisation intratrachéale, surtout dans les cas des germes virulents, tels que bacilles du groupe typhique ou dysentérique.

Par la voie trachéale on pourra très facilement obtenir des sérums précipitants que l'on utilise en médecine légale pour différencier les albumines; on pourra par le même procédé préparer des sérums hémolytiques et des sérums fortement bactéricides.

Il y aura lieu de rechercher si, en administrant aux grands animaux fournisseurs de sérums des vibrions cholériques par la trachée, il ne serait pas possible de produire un sérum anticholérique plus actif que celui qu'on obtient par les méthodes ordinaires. Nous rappelons ici le pouvoir de résorp-

tion à peu près illimité de la muqueuse respiratoire du cheval et la simplicité de la technique de l'injection.

Il y aura lieu de voir si cette méthode d'administration est susceptible de produire, d'une façon générale, des sérums actifs contre les microbes pathogènes (virus de la peste bubonique, méningocoques, bacilles du rouget du porc, bacilles du charbon, etc.).

La vaccination intratrachéale est indiquée en cas de microbes (streptocoques, bacilles du rouget de porc, bacille de la peste) qui au cours de l'immunisation provoquent chez les animaux producteurs du sérum des troubles locaux, par exemple, des arthrites. Il est possible que le procédé des injections intratrachéales nous ouvre encore des perspectives en ce qui concerne l'immunisation active dans la tuberculose des bovidés. Les résultats obtenus au cours de nos recherches sur l'immunité active, joints à ceux que Besredka a obtenus dans la tuberculose expérimentale du lapin, semblent justifier cet espoir.

Enfin, dans bien des maladies contagieuses, l'administration de sérums pourra être tentée par la voie respiratoire.

Nous sommes heureux d'exprimer ici à M. le professeur Besredka, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, nos bien sincères remerciements aussi bien pour le sujet du présent travail que pour l'intérêt qu'il nous a toujours témoigné.

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES
EXÉCUTÉES AU SUJET D'UNE ÉPIZOOTIE PORCINE

par le Dr R. BRUYNOGHE, professeur à l'Université de Louvain
et E. LEYNEN, inspecteur-vétérinaire à Louvain.

Depuis que l'élevage du porc s'est intensifié, on a observé dans tout le pays, et à ce qu'il paraît d'une façon spéciale dans les environs de Louvain, des épizooties causant de réels ravages.

Le ministère de l'Agriculture nous a chargé d'étudier ces épizooties au point de vue bactériologique, et c'est le résultat de ces recherches que nous avons l'avantage d'exposer brièvement.

Nous avons reçu pour l'analyse, en tout vingt produits provenant d'animaux morts ou malades ; nous y avons trouvé :

6 fois le bacille du rouget ;
7 fois un bacille paratyphique ;
1 fois un bacille pathogène non identifié et
6 fois des microbes banaux, tels que le staphylocoque, le colibacille, le *Bacillus fluorescens*, *liquefaciens*, etc.

Ces germes saprophytes ont été isolés pour la plupart d'échantillons de sang prélevé au lobe de l'oreille de l'animal en vie, et il est possible que, dans ces conditions, quelquefois l'agent pathogène ait échappé à nos investigations, à cause de la surabondance des microbes de contamination.

Dans les organes remis pour l'analyse sans trop de retard, le germe pathogène existait généralement en culture pure et il a été isolé tantôt par culture sur gélose, tantôt par inoculation d'animaux de laboratoire.

Afin de simplifier notre exposé, nous diviserons notre rapport en trois chapitres distincts où nous traiterons séparément les recherches relatives au rouget, celles se rapportant au bacille paratyphique et celles concernant le bacille non identifié ; enfin nous envisagerons sommairement la question de la vaccination préventive.

CHAPITRE I

ROUGET

Dans tous ces cas, le bacille en question a été isolé des organes de porcs morts ou abattus (rate, foie, poumon) par culture en strie sur gélose inclinée. Le développement caractéristique ainsi obtenu a été identifié par l'examen microscopique, par la culture du microbe sur les divers milieux et par l'inoculation de souris et de cobayes. Toutes nos souches isolées étaient inoffensives pour les cobayes et pathogènes pour les souris. D'après leur virulence, elles tuaient ces dernières en deux à cinq jours.

Nous n'allons pas nous étendre davantage sur les caractères de ces germes; ceux-ci sont exactement décrits dans tous les traités classiques.

Une question qui, à notre connaissance, n'était pas résolue, c'était celle relative à l'unité ou à la pluralité des souches de rouget.

Etant en possession d'un assez grand nombre de celles-ci, nous avons cherché à élucider ce problème. En effet, s'il est prouvé qu'il peut exister des souches différentes de rouget, il importe d'en préciser le nombre afin que toutes soient utilisées pour la vaccination préventive et pour la préparation du sérum spécifique. Ces recherches nous semblaient d'autant plus indiquées que, d'après certaines observations, des cas de rouget avaient été constatés chez des animaux qui avaient subi la vaccination.

Pour résoudre le problème envisagé, nous avons examiné les propriétés fermentatives et biologiques de nos diverses cultures. Ces recherches ont en réalité pu porter sur onze cultures différentes dont ci-après la provenance :

a) Six avaient été isolées par nous;

b) Deux provenaient de notre collection de microbes et

c) trois (les souches Pasteur, Petit et Colon) nous avaient été remises par l'Institut Pasteur de Paris. Nous en profitons ici pour exprimer à M. le professeur Calmette tous nos remerciements pour cette obligeance.

Nous avons examiné l'activité fermentative de nos cultures pour les sucres suivants : le glucose, le lactose, le saccharose, le maltose et la mannite. Nous avons utilisé à cet effet un milieu de culture préparé d'après la formule de Barsiekow dont ci-dessous la composition :

1 gr. de sucre,
1 gr. de peptone,
1 gr. de nutrose,
1/2 gr. de sel de cuisine,
100 gr. d'eau et 5 cent. cubes de teinture de tournesol.

Toutes nos souches attaquaient faiblement, sans production de gaz, le glucose et le lactose et faisaient de ce fait virer un peu ces milieux au rouge. Dans les autres sucres, il ne se produisait aucune fermentation, sauf que la souche Pasteur nous a semblé modifier un peu la coloration du milieu maltosé.

Pour étudier les propriétés biologiques ou sérologiques de nos souches, nous avons préparé des sérums monovalents dont nous avons examiné l'activité vis-à-vis de nos diverses cultures.

Nous avons employé pour la préparation de ces sérums des cobayes et des lapins.

Les premiers ont été injectés trois fois, à huit jours d'intervalle, avec des cultures vivantes (4 cent. cubes d'une culture en bouillon ordinaire âgée de quarante-huit heures). Ces sérums étaient pour ainsi dire totalement inactifs et de chef impropres aux recherches envisagées.

Par contre, un lapin inoculé trois fois, à trois ou quatre jours d'intervalle, avec une culture tuée de rouget Petit (culture en bouillon ordinaire) nous a fourni un sérum bien actif dont nous avons déterminé la teneur en substances sensibilisatrices et en agglutinines pour nos diverses souches.

Enfin, dans un essai nous avons examiné la valeur préventive de ce sérum contre l'infection expérimentale.

Ci-dessous le résultat de ces recherches :

1° Dosage des substances sensibilisatrices.

Pour faire ce dosage nous mettons dans une série de tubes :

a) Une dose constante de culture de rouget en bouillon, 0,25 cent. cubes ;

b) Des doses décroissantes du sérum antirouget Petit chauffé à 56° durant une demi-heure ;

c) Un vingtième de centimètre cube d'alexine.

Après une heure de séjour à l'étuve, nous ajoutons au contenu de ces tubes le système hémolytique, soit 1 centimètre de globules dilués à 1 sur 20 dans de l'eau physiologique et chargés d'une dose d'hémolysine représentant sensiblement cinq fois le titre de celle-ci.

Comme contrôles, nous avons les essais suivants :

a) Double dose de culture rouget + 1/20 cent. cube d'alexine ;

b) Double dose de sérum + 1/20 cent. cube d'alexine ;

c) 0,25 cent. cube de bouillon ordinaire + doses décroissantes de sérum antirouget + 1/20 cent. cube alexine.

CULTURES	DOSES DE SÉRUM ANTI ROUGET (PETIT)				
	0,1	1/50	1/200	1/400	1/800
R. Petit	+ + (1)	+ +	F. +	— (2)	—
R. Pasteur	+ +	+ +	+	—	—
R. Colon	+ +	+ +	+	—	—
R. I	+ +	+ +	+	—	—
R. II	+ +	+ +	F. +	—	—
R. III	+ +	+ +	+	—	—
R. Mis	+ +	+ +	+	—	—
R. Vau	+ +	+ +	+	—	—
R. Est	+ +	+ +	+	—	—
R. Mahio	+ +	+ +	+	—	—
R. Want	+ +	+ +	+	—	—
Bouillon ordinaire	+ +	—	—	—	—

(1) + + indique la déviation de l'alexine et l'absence d'hémolyse.
(2) — signifie l'inverse.

Ainsi qu'il résulte d'une façon évidente de l'examen de ce tableau, notre sérum antirouget monovalent (Petit) dévie l'alexine avec la même intensité quelle que soit la souche employée comme antigène. Les légères différences notées ne doivent être attribuées à la provenance de la culture, mais au développement plus ou moins abondant de nos diverses souches, ce qui entraîne évidemment de petites différences dans les doses

d'antigène utilisées. D'ailleurs dans d'autres essais, nous avons observé des variations analogues, mais cette fois pour des cultures qui avaient dévié dans la recherche précédente le mieux l'alexine.

2° Dosage des agglutinines.

Pour ces essais, nous avons utilisé des cultures en bouillon additionné de liquide d'ascite. Dans ce milieu, le développement était assez abondant pour avoir une émulsion suffisamment dense pour les recherches en question :

CULTURES	DOSES DÉCROISSANTES SÉRUM ANTI ROUGET (PETIT)				
	1/10	1/50	1/100	1/200	Contrôle
R. Petit	+ +	+ +	+	—	—
R. Pasteur	+ +	+ +	F. +	—	—
R. Colon	+ +	+ +	F. +	—	—
R. 3	+ +	+ +	F. +	—	—
R. 4	+ +	+ +	+	—	—
R. 5	+ +	+ +	F. +	—	—
R. Est	+ +	+	+	—	—
R. Waut	+ +	+ +	F. +	—	—
R. Mahio	+	+	F. +	—	—

Notre sérum n'était pas très agglutinant et la réaction ne se produisait que lentement (au bout de quatre à cinq heures d'étuve). Malgré cela, l'agglutination était bien spécifique et elle faisait complètement défaut dans les essais exécutés avec du sérum ordinaire ou avec un sérum agglutinant pour un autre microbe (par exemple, sérum antiparatyphique).

De ces recherches ainsi que de celles relatives à la déviation de l'alexine, il résulte qu'un sérum antirouget monovalent exerce la même influence sur les diverses cultures de rouget et qu'il n'y a donc pas lieu, comme pour d'autres microbes pathogènes, d'admettre l'existence de races biologiques distinctes les unes des autres.

Nous sommes arrivés au même résultat en inoculant des souris avec ce sérum et des cultures. La valeur préventive de la sérothérapie dépendait exclusivement de la virulence de la

souche inoculée. Ainsi les souris injectées avec la culture « rouget Petit » sont mortes malgré l'administration de 2/10 de cent. cube de sérum antirouget « Petit », alors que celles injectées avec une souche de rouget moins virulente sont restées en vie grâce à cette sérothérapie.

CHAPITRE II

BACILLE PARATYPHIQUE

En 1917 et 1918, l'un (1) de nous avait isolé des organes de porcs morts, ou d'animaux abattus parce qu'ils toussaient et dépérissaient, un bacille paratyphique spécial qu'il avait sommairement décrit dans une communication faite à la Société belge de biologie.

Au cours de nos recherches actuelles, nous avons isolé de nouveau à diverses reprises ce même microbe dont nous avons cherché, par de nouvelles investigations, à déterminer mieux l'identité et l'action pathogène.

Une première question qu'il fallait résoudre, c'était d'établir si le germe isolé était un simple surinfectant de la peste porcine analogue ou identique au bacille suipestifer, ou s'il était l'agent causal d'une maladie distincte.

Nos recherches et observations plaident pour la seconde thèse, étant donné :

1° Que les porcs autopsiés ne présentaient des lésions évidentes qu'au niveau de l'appareil respiratoire (broncho-pneumonie, œdème et infarctus pulmonaires) surtout dans la partie antérieure du lobe supérieur et médian et que les lésions intestinales, qui sont généralement fort étendues dans la peste porcine, faisaient complètement défaut;

2° Que les vaccinations pratiquées avec des cultures tuées des microbes en question ont réussi à enrayer l'épizootie dans des porcheries infestées. Il est évident que si on avait eu affaire à la véritable peste porcine, les injections de ce vaccin n'auraient pas pu influencer la marche de l'épizootie ;

3° Que nous avons inoculé à deux reprises des porcelets avec

(1) Bruynoghe. *C. R. de la Soc. belge de Biol.*, 28 juin 1919.

le filtrat d'organes de porcs morts de cette infection paratyphique sans produire ainsi la peste. Pour ces inoculations, nous avons utilisé dans un essai le filtrat d'une rate et dans un autre celui du poumon.

Ajoutons à cela que d'autres auteurs (Glässer (1), Dammann et Stedefeder (2), etc.) ont décrit également des épizooties porcines d'origine paratyphique. D'après Cominotti (3), ces affections paratyphiques ne seraient transmissibles que pour autant qu'elles seraient produites par la souche paratyphique « Voldagsen », l'inoculation du bacille suipestifer donnant naissance, d'après cet auteur, à une affection non contagieuse.

Quant au rapport existant entre nos diverses souches, nos recherches établissent qu'elles sont toutes agglutinées au même titre par des sérums monovalents. L'un de ceux-ci a été préparé en 1918 en injectant au lapin des cultures tuées de la souche Wil., l'autre en 1920 en utilisant comme vaccin la culture Frat. Ces essais d'agglutination ont porté, si nous y joignons ceux pratiqués en 1918, sur dix-sept souches (cultures provenant de porcs différents).

Nous donnons ci-dessous le résultat de l'agglutination de quelques souches récemment isolées.

CULTURES	SÉRUM ANTI-WIL.						
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	Contrôle
Mar.	+ + +	+ + +	+ +	+ +	+	+	—
Dim.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—
Gr. R.	+ + +	+ + +	+ + +	+	+	?	—
Waut.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	+	—
Frat.	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	?	—

Etant donnés ces résultats, il est évident que toutes ces cultures forment une seule et même variété.

Reste à élucider maintenant le rapport existant entre ce microbe et le bacille suipestifer.

(1) Glasser. *Deut. tierärztl. Wochenschr.*, 1907.
(2) Dammanm et Stedefer. *Arch. f. Wiss. und prakt. Tierh.*, 1910
(3) Cominotti. *Clinica veterinaria*, 1919.

Les recherches instituées pour résoudre cette question ont établi : 1° Que le sérum antisuipestifer actif 1 : 800, préparé en inoculant au lapin une culture tuée d'une souche de suipestifer reçue de l'Institut Pasteur de Paris, n'agglutinait aucune de nos cultures paratyphiques isolées du porc. Cette absence d'agglutination a été constatée aussi bien avec des cultures fraîchement isolées qu'avec des cultures repiquées régulièrement depuis plusieurs mois ;

2° Que nos deux cultures de suipestifer (l'une provenant de notre collection, l'autre de la collection de l'Institut Pasteur) n'étaient pas agglutinées, pas même à 1 : 25, par nos deux sérums antiparatyphiques (anti-Wil. et anti-Frat.).

Nous ne voulons pas prétendre pour cela qu'il y a lieu de différencier complètement notre bacille paratyphique du *Bacillus suipestifer*, étant donné que d'autres auteurs, entre autres Gildemeister et Haendel (1), ont isolé également de semblables germes dont quelques-uns, dans la suite, ont pu être identifiés au point de vue sérologique avec le *Bacillus suipestifer*.

Nous faisons toutefois remarquer que nos deux souches authentiques de suipestifer montrent au point de vue de l'agglutination, une parenté nette avec les microbes du groupe du *Bacillus* Gärtner, alors que nos cultures paratyphiques du porc ne sont pas influencées par ce sérum et se comportent comme si elles formaient plutôt un groupe sérologique distinct de l'*Enterides* et du paratyphus B.

Pour ne pas allonger démesurément notre exposé, nous n'allons pas donner ici le résultat de tous nos essais d'agglutination ; nous nous contenterons de faire remarquer que la parenté entre le *Bacillus suipestifer*, le *Bacillus enteritidis* Gärtner, le bacille du typhus des souris et des rats est telle qu'il n'est pas possible de différencier sérologiquement ces diverses cultures les unes des autres, alors que ces différents sérums (antisuipestifer, antienterides et antityphus souris) sont sans action sur nos cultures paratyphiques isolées du porc.

Nous avons examiné le pouvoir fermentatif de quelques-unes des souches isolées au cours des analyses exécutées en 1919 et 1920.

(1) Hændel et Gildemeister. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1911.

Nous avons utilisé à cet effet le milieu de Barsiekow préparé avec les divers sucres, comme il a été indiqué plus haut.

Ci-dessous le résultat de ces essais :

CULTURES	GLUCOSE	LACTOSE	SACCHAR.	MALTOSE	MANNITE
Dim.	+	—	—	+	+
Mar.	+	—	—	+	+
Gr. R.	+	—	—	+	+
Waut.	+	—	—	+	+
Frat.	+	—	—	—	—

REMARQUE : + indique qu'il y a fermentation et — qu'elle fait défaut.

Dans tous les milieux où le sucre subissait la décomposition, le contenu des tubes prenait une coloration rouge et la nutrose y subissait la coagulation.

Ainsi qu'il résulte des recherches mentionnées dans le tableau ci-dessus, quatre des cinq souches examinées faisaient fermenter comme le bacille suipestifer, le glucose, le maltose et la mannite et une ne faisait fermenter que le glucose.

Cette dernière souche différente du bacille suipestifer, au point de vue du pouvoir fermentatif, se distingue également de la souche « Voldagsen », étant donné que celle-ci décompose le glucose et le maltose.

Quoique nous ayons toujours obtenu le même résultat dans des essais de fermentation répétés à des intervalles de plusieurs semaines, nous ne croyons pas qu'il y ait lieu de distinguer les unes des autres ces souches de paratyphus et cela, parce que nous considérons le pouvoir fermentatif de ces germes comme insuffisamment stable pour servir de base à une différenciation. Les microbes de ce groupe peuvent perdre dans certaines conditions l'une ou l'autre de leurs propriétés fermentatives pour, éventuellement, les reprendre dans la suite (mutations).

L'un (1) de nous a décrit un fait analogue pour les bacilles pseudo-dysentériques.

Malgré cette différence dans les propriétés fermentatives, comme nous l'avons déjà indiqué, toutes ces souches étaient

(1) BRUYNOGHE. *C. R. de la Soc. belge de Biol.*, 1920.

également agglutinées par les sérums anti-Wil. et anti-Frat. Il en était de même de la souche « Voldagsen » obligeamment mise à notre disposition par Cominotti.

D'après les indications de cet auteur italien, la souche Voldagsen n'est pas à distinguer sérologiquement du *Bacillus suipestifer*. Dans nos essais cette distinction s'imposait ainsi qu'il résulte du tableau ci-dessous :

CULTURES	SÉRUM ANTISUIPESTIFER						
	1/50	1/100	1/300	1/400	1/800	1/1.600	Contrôle
B. suipestifer	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	?	—
B. typhus des souris . . .	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	?	—
B. enteritidis Gärtner . .	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+	—	—
B. Voldagsen.	—	—	—	—	—	—	—
Dim..	—	—	—	—	—	—	—
B. Waut. . .	—	—	—	—	—	—	—

Nous croyons que cette différence dans les essais d'agglutination doit s'expliquer par la nature du bacille suipestifer employé. Si nous avions utilisé, pour la préparation du sérum antisuipestifer, des bacilles paratyphiques identiques à nos souches Dim. Mar. Waut, etc., il est évident que nous aurions obtenu des résultats tout à fait semblables à ceux de Cominotti. Comme nous l'avons déjà écrit, nous croyons qu'il ne faut pas identifier ces souches avec le bacille suipestifer authentique.

Quant à la virulence des bacilles en question, les souches pourvues de propriétés fermentatives pour les trois sucres (glucose, maltose et mannite) étaient les plus virulentes ; elles étaient pathogènes, dans tous les essais, pour les cobayes et les souris. La virulence de la souche Voldagsen et de notre souche Frat. était atténuée pour ces animaux : la culture Voldagsen tuait encore les souris et était sans action pour les cobayes ; la culture Frat. n'était pathogène que pour des jeunes souris. Cette dernière souche avait été isolée du poumon d'un porc mort dont l'autopsie avait révélé l'existence de foyers de pneumonie vermineuse et de petits foyers congestionnés de bronchopneumonie.

Quant à l'action pathogène pour les porcs, étant donné le coût actuel de ces animaux, nous n'avons pas pu faire toutes les recherches projetées et nous avons dû nous contenter de quelques essais. La culture Vaut. inoculée à la dose d'un cent. cube dans la veine marginale de l'oreille d'un porc de 20 à 25 kilos, l'a tué au bout de vingt-quatre heures. Il présentait à l'autopsie un épanchement pleural séreux bilatéral et des foyers multiples de broncho-pneumonie. Un autre animal injecté par voie sous-cutanée avec 3 cent. cubes de la culture Mar. conservée depuis plusieurs mois au laboratoire, n'a présenté qu'une indisposition passagère (toux, amaigrissement) de cinq à six jours.

CHAPITRE III

BACILLE NON IDENTIFIÉ

Nous avons isolé ce bacille une fois au cours des recherches récentes et quatre fois au cours des analyses exécutées en 1918. Nous avons trouvé ce microbe dans les lésions pulmonaires d'animaux atteints de pleuro-pneumonie. Ces lésions étaient tellement caractéristiques que macroscopiquement elles se différenciaient d'emblée de celles produites par le bacille paratyphique. Elles étaient très vastes et le poumon au niveau de ces foyers était complètement hépatisé (hépatisation grise) et en imposait pour du tissu qui avait subi l'ébullition. La plèvre était également enflammée, épaissie et adhérente surtout au niveau des parties hépatisées. Dans un cas, nous avons constaté, en dehors des foyers décrits, plusieurs tubercules grisâtres au niveau des sommets pulmonaires.

Etant donnée la nature des lésions, notre première impression était que nous avions affaire à de la pleuro-pneumonie contagieuse, vu surtout que l'examen microscopique des frottis du poumon y montrait une masse de bacilles présentant assez bien la coloration bipolaire. A côté de ces microbes qu'on aurait à la rigueur pu prendre à première vue pour une variété de pasteurella (le *Bacillus suisepticus* de Schütz) (1), il y avait d'autres éléments qui avaient un aspect tout différent : des

(1) SCHUTZ. *Arb. a. d. Ges.-Amt.*, 1886.

coccus, de gros diplocoques rappelant par leur forme les pneumocoques, des bacilles plus ou moins longs dont quelques-uns présentaient des irrégularités rappelant un peu les divisions des moisissures. Comme nous le verrons dans la suite, toutes ces formes n'étaient pas l'indice d'une infection associée, mais provenaient du polymorphisme du bacille en question. Nous n'avons pas affaire non plus à une moisissure plus ou moins banale, car, quelle que fût la méthode de coloration employée, nous n'avons jamais pu mettre d'éléments nucléés en évidence dans les bacilles envisagés.

Pour procéder avec ordre dans la description de ce germe, nous indiquerons successivement ses caractères de culture, son action pathogène, et nous donnerons pour terminer quelques caractères de différenciation entre ce microbe et quelques autres germes pathogènes pour le porc.

Notre bacille pousse mal sur gélose ordinaire. Les premiers ensemencements donnent toutefois, surtout quand ils sont pratiqués avec du sang du cœur d'un animal mort à la suite de l'inoculation expérimentale, un développement assez abondant. Au bout de 18 à 24 heures d'étuve, il se produit des colonies arrondies légèrement opalescentes au début, ayant environ un millimètre de diamètre. Repiquées sur un autre tube de gélose, pourvu que l'ensemencement ait été massif, il se produit encore du développement assez marqué, mais au fur et à mesure que les réensemencements se succèdent, la culture devient de moins en moins abondante pour finalement ne plus se faire, surtout quand les repiquages se font un peu irrégulièrement.

A l'examen microscopique de ces cultures, on trouve des éléments très différents : des bacilles longs de 2 à 10 μ ayant les extrémités nettement arrondies, tantôt isolés, le plus souvent placés par deux, quelquefois en chaînettes de 3 à 5 éléments. Leur largeur varie de 0,5 à 0,8 μ. Les éléments très allongés sont souvent un peu incurvés et quelques-uns présentent des parties plus renflées. On trouve aussi dans ces cultures des formes de gros coques isolés ou associés par deux. Certains éléments présentent un début de segmentation ressemblant un peu à la division des moisissures.

Quand on ensemence de la gélose avec une culture en bouil-

lon, il ne se produit habituellement aucun développement, alors que cette culture repiquée sur bouillon pousse normalement.

Ces bacilles ou coques prennent uniformément la matière colorante, sont Gram négatifs et immobiles.

Dans le bouillon, il se produit un trouble uniforme ressemblant au développement du bacille du rouget, mais s'en distinguant par le fait qu'il est plus abondant. A la longue, le bouillon s'éclaircit un peu et il se produit une sédimentation au fond du tube. Il ne se forme jamais de voile à la surface.

Au bout de quelques jours d'étuve, la culture fournit toujours très nettement la réaction de l'indol et elle dégage une odeur très semblable à celle des cultures de choléra. Dans le bouillon, les cultures restent en vie durant plusieurs semaines.

Nous n'avons jamais constaté de sporulation.

Sur sérum coagulé, le bacille se développe sans peptoniser le milieu.

Le lait n'est pas coagulé.

Sur pommes de terre, il se produit un fin enduit plus ou moins luisant.

Le microbe ne se développe pas à la température ordinaire, il ne liquéfie pas la gélatine et pousse le mieux en milieu aérobie.

Ce bacille est très virulent pour le cobaye. Il suffit de lui injecter une fraction de centimètre cube de culture pour le tuer. La mort survient plus ou moins rapidement suivant la dose inoculée et la voie choisie pour cette injection. La voie intrapéritonéale est la plus sévère.

Quand l'injection s'est faite sous la peau, il se produit à l'endroit de l'injection un foyer purulent. Le péritoine, la plèvre et le péricarde sont habituellement remplis de pus. Les poumons sont congestionnés et, quelquefois, on constate des adhérences pleurales. Le bacille se trouve dans tous les organes. On en trouve des masses dans le péritoine. La plupart ont la forme de bacilles assez allongés avec des extrémités plus ou moins effilées et plus intensément colorées que le centre.

Ce microbe est très peu pathogène pour la souris et il faut de grandes quantités de culture pour la tuer. Quand elle succombe à la suite d'une injection massive, on n'y constate ni

suppuration, ni épanchement purulent, et les organes contiennent très peu de bacilles.

Quand nous envisageons les caractères de ce bacille, nous ne pouvons l'identifier avec aucun des germes pathogènes décrits.

Il existe tant de différence entre ce microbe et les bacilles du rouget et du paratyphus, qu'il n'y a pas lieu de mentionner les caractères de différenciation. Cette mention est seule d'utilité pour le *Bacillus suisepticus* de Schütz et le *Bacillus hyopyogenes* de Grips.

Le *Bacillus suisepticus* se distingue de notre germe par les particularités suivantes :

1° Il est beaucoup plus court et, dans les exsudats, ses extrémités sont bien arrondies et non effilées;

2° Il produit dans le bouillon un trouble uniforme et un léger voile à la surface; sur pommes de terre il n'y a pas de développement;

3° Il est pathogène pour les souris et le lapin sans l'être pour le cobaye.

Le *Bacillus hyopyogenes* de Grips a comme caractères distinctifs :

1° D'être beaucoup plus court, Gram positif, et de ne pas présenter de coloration bipolaire ;

2° De coaguler le lait et de peptoniser le sérum coagulé;

3° De ne pas être pathogène pour le cobaye.

VACCINATION

Nous avons utilisé comme vaccin, suivant les cas, des cultures tuées, soit de paratyphus, soit de paratyphus et du bacille décrit dans le chapitre précédent. La concentration de l'émulsion était telle qu'elle se rapprochait sensiblement de celle utilisée en médecine humaine, soit un milliard de germes par centimètre cube.

Les animaux ont reçu deux ou trois injections de doses variant de 1 à 3 cent. cubes suivant leur poids. Ces vaccinations n'ont été faites que dans des exploitations infestées, sur des

porcs indemnes de manifestations morbides évidentes au moment des injections.

Nous ne pouvons pas nous prononcer définitivement sur la valeur de cette méthode étant donné que, d'une part, nos essais n'ont pas été assez nombreux et que, d'autre part, nous avons dû nous fier dans la plupart des cas, pour apprécier l'effet, aux renseignements souvent incomplets fournis par les praticiens. Pour autant que nous avons réussi à les recueillir, l'appréciation a toujours été favorable.

Dans un cas, nous avons pu instituer une vaccination dans des conditions telles qu'elle constitue en quelque sorte une expérience.

Voici sommairement les détails de cet essai.

En 1918, éclate dans une porcherie du Comité National (Lovenjoul) une maladie qui faisait journellement des victimes dans l'établissement.

L'un de nous fut chargé d'examiner, au point de vue bactériologique, les organes des animaux morts. Il y trouvait, outre le bacille paratyphique spécial qu'il avait déjà isolé dans d'autres foyers épizootiques, le bacille non identifié décrit au chapitre III.

Il a préparé alors un vaccin constitué de cultures de ces deux microbes que son ami, le vétérinaire Missoul, a injecté trois fois à tous les animaux. On n'a pris aucune autre mesure de prophylaxie et on n'a rien changé au régime. Après la seconde injection de vaccin, il n'y a plus eu qu'un seul décès.

A partir de ce moment, dans cette porcherie où il y avait environ une centaine d'animaux et où il se produisait avant régulièrement 3 ou 4 décès (quelquefois plus) par semaine, tous les porcs sont restés dans la suite sans accidents.

Ces résultats très encourageants méritent, nous semble-t-il, d'instituer en l'occurrence de nouveaux essais pour permettre de juger définitivement la valeur de cette vaccination. Nous croyons même que, quand on tient compte du fait qu'il est si difficile et souvent même impossible de distinguer cliniquement le rouget du paratyphus du porc et éventuellement d'autres affections, qu'il y aurait avantage d'associer à la vaccination contre le rouget celle contre le bacille paratyphique, et cela

parce que ce microbe intervient si fréquemment comme agent pathogène chez ces animaux.

En agissant ainsi, on utiliserait une mesure prophylactique de portée plus générale que celle de la simple vaccination contre le rouget. Sans aucun doute, on aurait moins d'échecs. Car il n'est pas rare de voir appliquer la vaccination contre le rouget, comme mesure prophylactique, pour des infections paratyphiques et évidemment sans le moindre succès.

LA CONCENTRATION OPTIMA EN IONS HYDROGÈNE FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE CERTAINS MICRO-ORGANISMES

par K. G. DERNBY,
de Stockolm (Suède).

(Travail du laboratoire de M. Levaditi à l'Institut Pasteur.)

INTRODUCTION

C'est un fait bien connu que la réaction du milieu joue un rôle important pour le développement des micro-organismes : quelques-uns d'entre eux préfèrent une réaction alcaline, d'autres une réaction acide ou neutre, et quelques bactéries même supportent des degrés élevés d'acidité ou d'alcalinité. On trouve dans tous les manuels des indications précises pour déterminer l'acidité ou l'alcalinité convenable du milieu. Presque toujours on opère de la façon suivante : le bouillon est neutralisé au tournesol ou à quelque autre indicateur et on ajoute ensuite quelques centimètres cubes de NaOH. Mais d'après le travail classique de Sörensen (1909), il est évident que le titrage d'acidité ou d'alcalinité n'indique pas la vraie acidité ou alcalinité, c'est-à-dire la concentration des ions (H) ou (OH) de la solution (1).

Pour mesurer cette concentration des ions (H), Sörensen avait préconisé deux méthodes : électrique et colorimétrique. Depuis dix ans ces méthodes ont créé une nouvelle ère dans la chimie physiologique. Cependant elles n'ont été employées en bactériologie que récemment, et ceci est dû à ce que la méthode électrométrique est un tant soit peu compliquée et que, dans la zone de neutralité, où la plupart des bactéries se développent,

(1) *p*H est le symbole proposé par Sörensen pour exprimer l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu. Il est mathématiquement le logarithme négatif, de base 10, de la concentration en ions hydrogène. Ainsi $pH = 7$ veut dire, une concentration en ions hydrogène $= 10^{-7}$, c'est-à-dire 0,000.000.1.

elle ne donne pas toujours des résultats satisfaisants, par suite de l'acide carbonique qui se dégage. Il était impossible au commencement d'employer la méthode colorimétrique de Sörensen parce que l'indicateur coloré, proposé par lui, introduisait, une erreur due à la présence des protéines, ce qui rendait impossible l'emploi de cette méthode dans des solutions qui contenaient des substances albuminoïdes.

Nous devons au chercheur américain William Mansfield Clark d'avoir adapté la méthode colorimétrique de Sörensen à un but bactériologique, en préparant une série d'indicateurs donnant un minimum d'erreurs. Les travaux de Clark et Lubs (1917) sont maintenant considérés comme classiques, et spécialement en Amérique et en Angleterre, et Ponselle vient, dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* (1920), d'attirer sur eux l'attention des bactériologistes français.

Leur importance réside dans le fait qu'ils permettent de fixer d'une façon certaine la réaction initiale d'un milieu de culture. Par suite, si nous préparons deux bouillons de viande de la même manière et si nous ajoutons, par exemple, dans chaque ballon 20 cent. cubes de NaOH*n*. par litre, il n'est nullement certain *a priori* que la concentration (H) sera la même dans les deux cas. Les bactériologistes connaissent bien les grandes difficultés qu'on a à préparer un milieu de culture pour des microbes très sensibles à l'acidité ou à l'alcalinité du milieu.

Quand on ensemence dix bouillons préparés exactement d'après les mêmes prescriptions et titrés au même degré d'alcalinité, avec le bacille diphtérique, souvent quelques-uns seulement fournissent une bonne culture. Il en est de même pour le pneumocoque. Dernby et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la concentration d' (H) (Dernby et Avery ; D. et David) pour ces deux microbes et ont trouvé qu'il est indispensable de contrôler la concentration (H).

Les premiers travaux sur les rapports entre la concentration (H) et la vie des bactéries eurent trait à la « valeur limite de *p*H », qui fut considérée comme un facteur significatif dans la classification des micro-organismes. Citons, comme exemple, les recherches de Michaelis et Marcora, et aussi de Clark pour le *B. coli*; Ayers (1916), Cullen et Avery pour le *streptocoque* et Itano (1916) pour le *Bacillus subtilis*. On trouva

ainsi que certains microbes, en se développant, produisaient des acides et que la valeur finale de *p*H était plus ou moins constante.

Cependant on formula des objections à la théorie de la « limite acide » (par exemple Jones 1919). Il a été démontré que les deux « limites d'acidité et d'alcalinité » dépendent de plusieurs facteurs ; constituants du milieu, présence des sucres, temps d'incubation, etc...

Ce qui est plus important c'est de déterminer la valeur optima *p*H, comme je l'ai exposé. J'ai d'abord étudié cette valeur pour le développement du bacille diphtérique et du pneumocoque, et j'ai constaté que la zone *p*H, dans les limites de laquelle les bactéries poussent, est plutôt étroite ; or, ces deux bacilles modifient la concentration d' (H) du milieu pendant leur développement. La réaction initiale devra donc toujours être déterminée, pour que les microbes puissent se développer dans des conditions optima.

Il en résulte l'importance de la *courbe de croissance* en relation avec *p*H. Nous représentons le degré de croissance en ordonnée et le *p*H en abscisse, de telle sorte que les limites de *p*H seront représentées par les points zéro, et *p*H optima par le maximum. Les « limites » peuvent varier et l'optimum aussi, mais dans son aspect général la courbe sera presque constante et constituera un élément utilisable dans la définition des espèces bactériennes.

Il serait désirable que les anciennes définitions employées dans les manuels de bactériologie, par exemple « B. X. pousse mieux dans les réactions faiblement alcalines », soient remplacées par les suivantes : « B. X. se développe pour *p*H, 6,0-7,5-8,5 » (le premier et le troisième chiffre étant les limites approximatives et le deuxième l'optimum).

Il est presque certain que la courbe de croissance établie pour la gélatine ou la gélose ne sera pas la même que pour le bouillon.

Les chiffres obtenus ne sont strictement valables que pour le milieu employé. Jones (1919), à propos de nos recherches sur le pneumocoque (Dernby et Avery), soutient que la limite pour le développement de ce microbe (pH $=$ 7) aurait été plus acide, par exemple pH $=$ 6, si nous avions ajouté du sucre ou

du sang au bouillon. Ceci est fort possible, mais nous avons précisément évité l'emploi du sucre, pour obtenir un optimum rigoureux et éviter ainsi une trop grande augmentation d'acidité au cours des essais. Cependant le travail de Jones montre que nous devons être très prudents en considérant comme facteur absolu la valeur limite de *p*H.

*
* *

MÉTHODES.

a) *Préparation du milieu.*

On doit choisir un milieu approprié, de préférence liquide afin de pouvoir facilement mesurer la concentration (H), et en deuxième lieu, il ne doit pas contenir de substances fermentescibles qui par production d'acide peuvent déterminer une modification de la concentration (H).

Un tel milieu est le bouillon de viande autolysé : 9 échantillons préparés à l'acide de ce milieu furent employés; tous contenaient la même quantité de bouillon, mais des proportions différentes d'HCl ou NaOH afin d'obtenir des concentrations (H) différentes pouvant être facilement reproduites.

Dans cette méthode toutes nos expériences ont été exécutées d'une façon uniforme, et par ce moyen, beaucoup d'erreurs furent évitées.

1 kilogramme de viande finement hachée fut plongé dans deux litres d'eau ordinaire et maintenu à la température de 37° pendant vingt-quatre heures pour l'autolyse, ensuite bouilli et filtré. On y ajoute 0,5 p. 100 de NaCl et 0,5 p. 100 de peptone, puis on stérilise pendant vingt minutes à 110°.

Le bouillon fut divisé en parties égales et versé dans 9 ballons, dans lesquels différentes quantités de HCl ou NaOH furent ajoutées, afin d'obtenir une série de concentrations (H) définies. Le tableau n° I indique la composition des 9 milieux-types, ainsi obtenus :

Il est avantageux de préparer une grande quantité de bouillon pour avoir des résultats comparables. Les chiffres du tableau ne sont valables que pour le bouillon utilisé, pour une nouvelle fabrication les valeurs *p*H doivent être vérifiées.

Le contenu des 9 ballons fut alors divisé en neuf séries de tubes à essai, 10 cent. cubes et tous les tubes furent restérilisés. On les laissa une journée à la température ambiante, afin d'obtenir une concentration stable en ions hydrogène.

TABLEAU I.

30 c.c. bouillon + HCl ou NaOH + H^2O = 32 c.c.				
N°	c.c. N NaOH	c.c. N HCl	c.c. H_2O	*p*H 24 heures après stérilisation
1	—	1,8	0,2	3,1
2	—	1,0	1,0	4,0
3	—	—	2,0	4,9
4	0,3	—	1,7	6,0
5	0,6	—	1,4	6,5
6	0,9	—	1,1	7,0
7	1,2	—	0,8	7,5
8	1,4	—	0,6	8,0
9	1,6	—	0,2	8,6

b) *Effet de la stérilisation sur la concentration (H) de bouillons mixtes.*

Il y a certaines difficultés pour déterminer exactement la concentration en ions hydrogène, et ceci est dû ordinairement aux changements de *p*H, causés par la stérilisation. Spécialement, lorsque le bouillon est fermenté, ces changements peuvent être considérables, comme l'indique les chiffres suivants :

*p*H avant la stérilisation.	7,0	7,3	7,6
*p*H immédiatement après la stérilisation .	7,3	7,6	8,2

L'explication probable de ce phénomène est la suivante : dans le bouillon fermenté, nous avons un équilibre entre les composés : carbonate de soude, bicarbonate de soude et CO^2. En chauffant, le mélange de CO^2 combiné ou libre de la solution sera dégagé, augmentant ainsi la concentration relative du carbonate de soude et rendant par ce moyen la réaction plus alcaline.

Mais si les ballons stérilisés ne sont pas mis en expérience immédiatement après refroidissement, mais deux ou trois jours après la stérilisation, on n'observera aucune augmentation d'alcalinité, la concentration en ions hydrogène étant pratiquement la même deux jours après comme avant la stérilisation, ainsi que l'indiquent les chiffres suivants :

*p*H avant la stérilisation.	7,0	7,3	7,6
*p*H 48 heures après la stérilisation	7,0	7,3	7,6

Ceci s'explique par le fait que pendant ce temps le CO^2 de l'air est absorbé et qu'un équilibre s'est rétabli à la température de la chambre froide entre le carbonate de soude, le bicarbonate de soude et le CO^2 libre.

Il est donc essentiel que les milieux de culture ne soient pas employés immédiatement après la stérilisation, mais bien après vingt-quatre heures au moins de repos.

c) *Examen du développement microbien.*

Les tubes sont ensemencés avec la même quantité d'une culture de vingt-quatre heures du micro-organisme examiné. Après un certain temps, le degré de croissance a été établi. La numération des colonies n'a pas été faite, mais on se borna à estimer s'il y avait formation de voile ou de trouble. Afin de représenter graphiquement les résultats, nous avons exprimé le degré de développement par des chiffres, au lieu de signes; c'est ainsi que 1 correspond à +, 2 à ++, etc.

On peut objecter que cette méthode est plus ou moins arbitraire, mais ceci n'est que secondaire; ce que nous voulons savoir, ce sont les valeurs de *p*H pour les limites et l'optimum du développement. Nous avons exécuté un grand nombre d'expériences parallèles, mais nous nous bornons à reproduire ici les courbes seulement.

Il est évident que les premières lectures de six et seize heures donnent la valeur optima en *p*H, tandis que les lectures de quarante-huit heures ou plus donnent les valeurs limites en *p*H.

Les courbes de la figure 1 indiquent les deux points : les valeurs limites *p*H et la valeur optima *p*H. Le gros trait indique la « courbe de croissance », telle qu'elle est donnée dans la figure 4.

TABLEAU II. — **Staphylococcus Boucicaut (Legroux).**

NUMÉRO	*p*H		DEGRÉ DE CROISSANCE APRÈS		
	Initial	Après 48 h.	8 heures	16 heures	48 heures
1	3,0	3,0	0	0	0
2	4,0	4,0	0	0	0
3	4,9	4,9	0	1	4
4	5,9	6,0	0	2	4
5	6,5	6,5	1	3	4
6	7,0	6,8	2	4	4
7	7,5	7,3	2	4	4
8	8,0	7,7	1	3	4
9	8,6	8,6	0	0	0

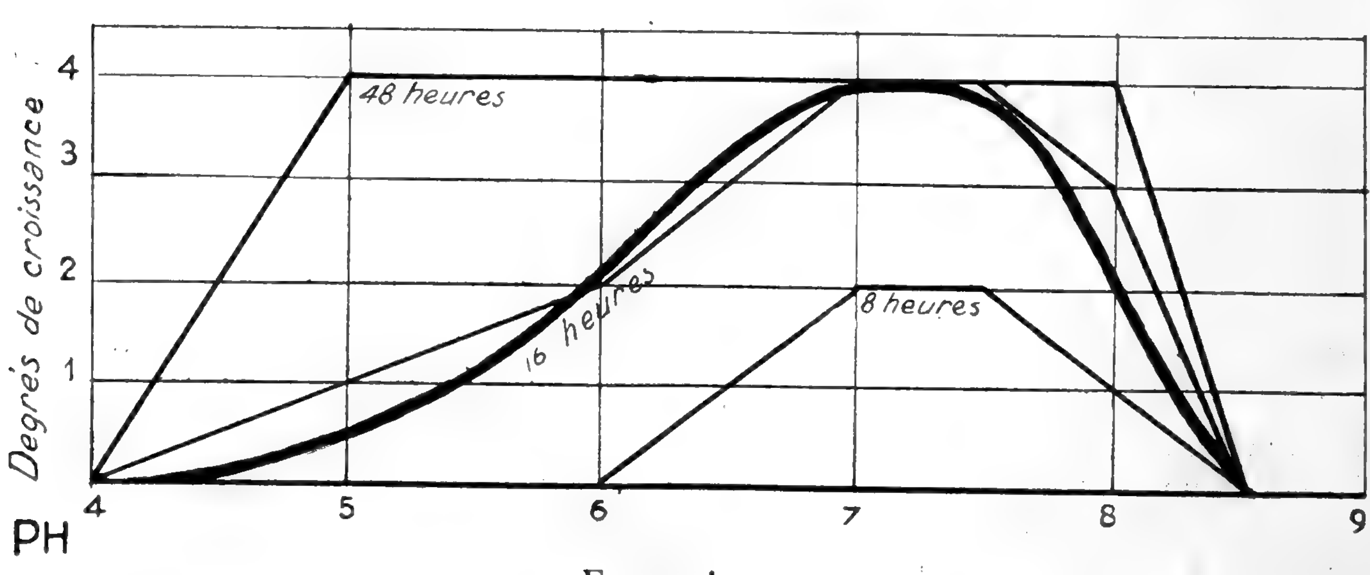


FIGURE 1.

d) *Détermination de la concentration en ions H.*

Pour déterminer les valeurs *p*H, nous avons employé la méthode colorimétrique de Sörensen et les indicateurs de Clark et Lubs. Dans ce court travail, il est impossible de décrire la manière complète de procéder, et c'est pourquoi nous nous permettons de nous référer aux travaux de Sörensen (1909), Michaelis (1914) et Clark et Lubs (1919).

Les indicateurs employés furent :

	Zone de *p*H
Bleu de thymol	1,2 — 2,8
Bleu de bromo-phénol	2,8 — 4,6
Rouge de méthyle	4,4 — 6,0
Rouge de propyle	4,8 — 6,4
Pourpre de bromo-crésol	5,2 — 6,8
Bleu de bromo-thymol	6,0 — 7,6
Rouge de phénol	6,8 — 8,4
Rouge de crésol	7,2 — 8,8
Phtaléine du crésol	8,2 — 9,8

Les solutions de contrôle furent celles proposées par Sörensen.

1°	HCl	1/10 mol.
2°	Citrate de soude	1/10 —
3°	KH^2PO^4	1/15 —
4°	$Na^2HPO^4.2H^2O$	1/15 —

La pureté des produits fut contrôlée par la méthode électrométrique.

En principe, toutes les solutions employées en bactériologie sont colorées ou troubles; ou l'un et l'autre, et c'est pourquoi certaines précautions doivent être prises afin de corriger la couleur ou le trouble des solutions. La méthode proposée par Walpole (1915) pour l'emploi d'un *comparateur* paraît être la meilleure.

Schématiquement, la méthode de Walpole est expliquée par la figure 2.

Derrière les tubes contenant les solutions de contrôle sont placés les tubes contenant les solutions d'épreuve. Dans tous les tubes de la première rangée on ajoute la même quantité d'indicateur. La couleur des solutions d'épreuve est la couleur corrigée.

La figure 3 donne un modèle de porte-tubes que l'auteur a employé et où la lumière réfléchie est employée au lieu de la lumière directe.

Cette méthode donne des résultats exacts et elle est très facile à effectuer. La valeur de *p*H peut être déterminée avec une approximation de 0,1.

Pour chaque expérience une série de tubes ensemencés fut employée, dont les valeurs de *p*H ont été préalablement déterminées.

Après incubation, la concentration (H) dans les tubes ensemencés fut de nouveau mesurée, et si quelque changement apparaît il est noté dans le compte rendu des expériences.

En fait, en employant le bouillon autolysé comme il a été décrit, il n'y a pas grande modification de la valeur *p*H au cours du développement.

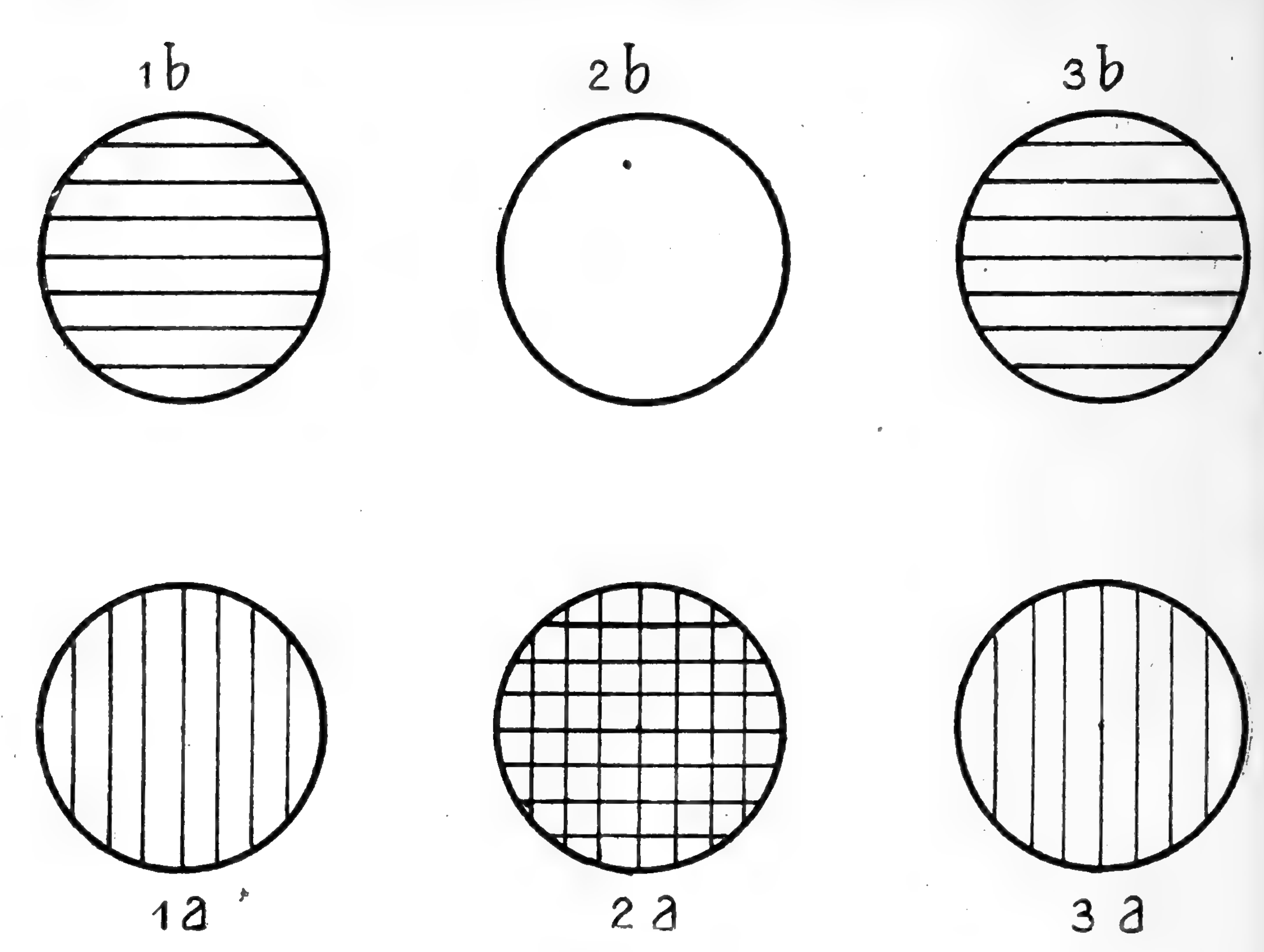


Fig. 2. — Schéma de Walpole :

1 *a* et 3 *a*, Solutions standardisées, dont le *p*H est connu, indicateur ajouté;
2 *a*, Liquide d'épreuve coloré par l'indicateur;
1 *b* et 3 *b*, Liquide d'épreuve sans indicateur;
2 *b*, Eau distillée.

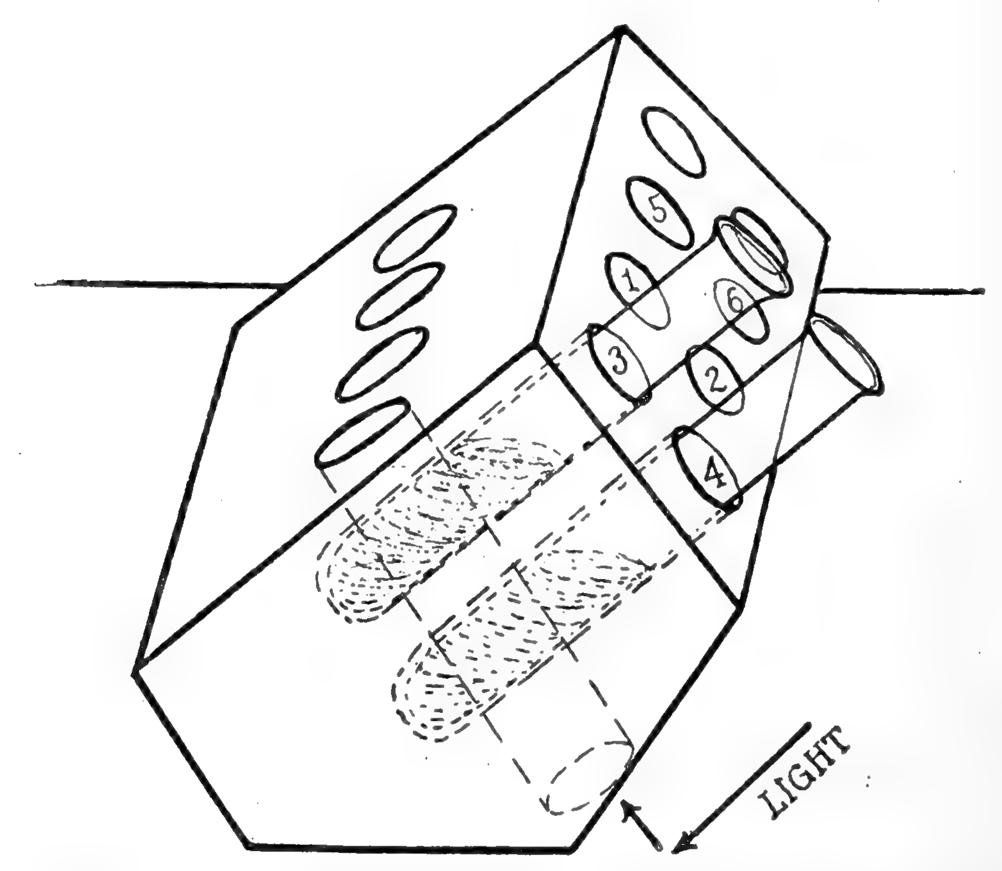


Fig. 3. — Appareil pour déterminer les concentrations des ions hydrogène dans les solutions colorées ou troublées (*Light* = lumière).

Résumé des résultats.

Il n'est guère possible de reproduire ici *in extenso* tous les protocoles d'expériences. Ils sont tous du type que présentent le tableau II et la figure 1. Les résultats sont résumés dans le tableau III et les figures 4 *a* et 4 *b*.

Tableau III.

NOMS DES MICROBES	LIMITES *p*H	*p*H OPTIMA	OBSERVATIONS
B. diphteriæ	6,0-8,3	7,3-7,6	Voir Dernby et David (1921) et Bunker (1919).
B. tuberculosis de cheval	6,0-7,6	6,8-7,2	Cultivé dans un bouillon avec et sans glycérine.
B. typhosus	6,2-7,6	6,8-7,2	Remarquer la zone de croissance étroite pour le *B. typhosus*, *B. coli* étudié avant par Michaelis et Marcora (1919) et Clark et Lubs (1917).
B. coli communis	4,4-7,8	6,0-7,0	
B. para A	4,5-7,8	6,4-7,0	
B. para B	4,5-8,0	6,4-7,2	
B. suipestifer	5,0-8,2	7,0-7,6	
Pyocyaneus	5,6-8,0	6,6-7,0	
Proteus vulgaris M	4,4-8,4	6,0-7,0	
— D			
— Ch			
Prodigiosus	5,0-8,0	6,0-7,0	
Vibrio choleræ	6,4-7,9	7,0-7,4	
Cinnabareus	5,0-7,8	6,0-7,0	
Pneumococcus (types I, II, III)	7,0-8,3	7,8	Voir Dernby et Avery (1918). Remarquer la petite zone de croissance. Jones a démontré (1919) que la zone en milieu acide donne au *p*H 6,0 si le glucose est présent et même descend à 5,0 si on ajoute du sang.
Streptococcus liquefaciens	5,5-8,0	6,2-7,0	Pour d'autres espèces de streptocoques voir Ayers (1916), Itano (1916), Cullen et Avery (1919) et Svanberg (1918).
Staphylococcus doré	5,6-8,1	7,2-7,6	Tous les types de ce groupe donnent une diminution d'alcalinité.
— blanc	5,6-8,1	7,2-7,6	
— rouge	5,6-8,1	7,2-7,6	
— Boucicaut	4,8-8,0	7,0-7,6	
— *neoformans*	5,0-8,0	6,5-7,1	

NOMS DES MICROBES	LIMITES *p*H	*p*H OPTIMA	OBSERVATIONS
Gonococcus	6,0-8,3	7,3	Etudié par l'auteur et le Dr Hedén. Voir Hedén (1920). Milieu : Agar-ascite. Le gonocoque produit une forte acidité. — Voir aussi Cole et Lloyd (1917).
B. subtilis.	4,5-8,5	6,0-7,5	Voir Itano (1916) qui cependant a trouvé des limites parfois plus larges.
B. anthracis.	6,0-8,5	7,0-7,4	
B. *anthracoides*	6,0-7,8	6,8-7,2	
Coccobacille de Pfeiffer . . .	6,2-7,6	7,0	Milieu avec extrait de globules sang unis.
B. pestis.	5,6-7,5	6,5-7,1	Fourni par M. Dujardin-Beaumetz.
Groupe des anaérobies :			
B. sporogenes. . . . . . *B. histolyticus* . . . . . . *B. canadiensis* . . . . . . *B. putrificiens* . . . . . . *B. perfringens*	5,8-8,5	6,0-7,6	En collaboration avec le Dr J. Blanc. Voir obs. Blanc (1921). Milieu + sulfure de calcium.
B. tetani	5,5-8,3	7,0-7,6	En collaboration avec le Dr B. Allander.

FIGURE 4 *a*.

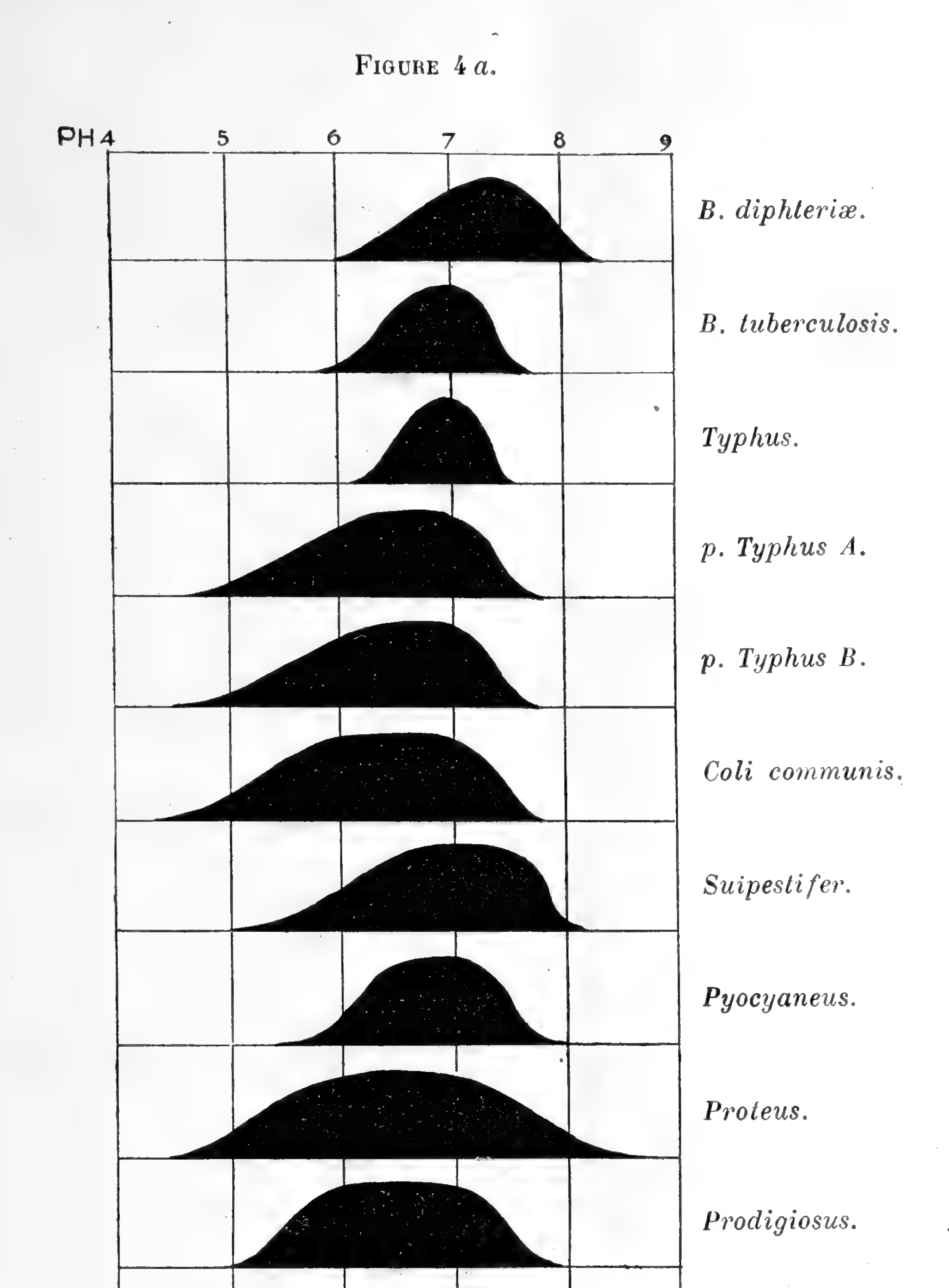


Diagramme montrant la croissance de certains micro-organismes en fonction de la concentration des ions hydrogène.

Figure 4 *b*.

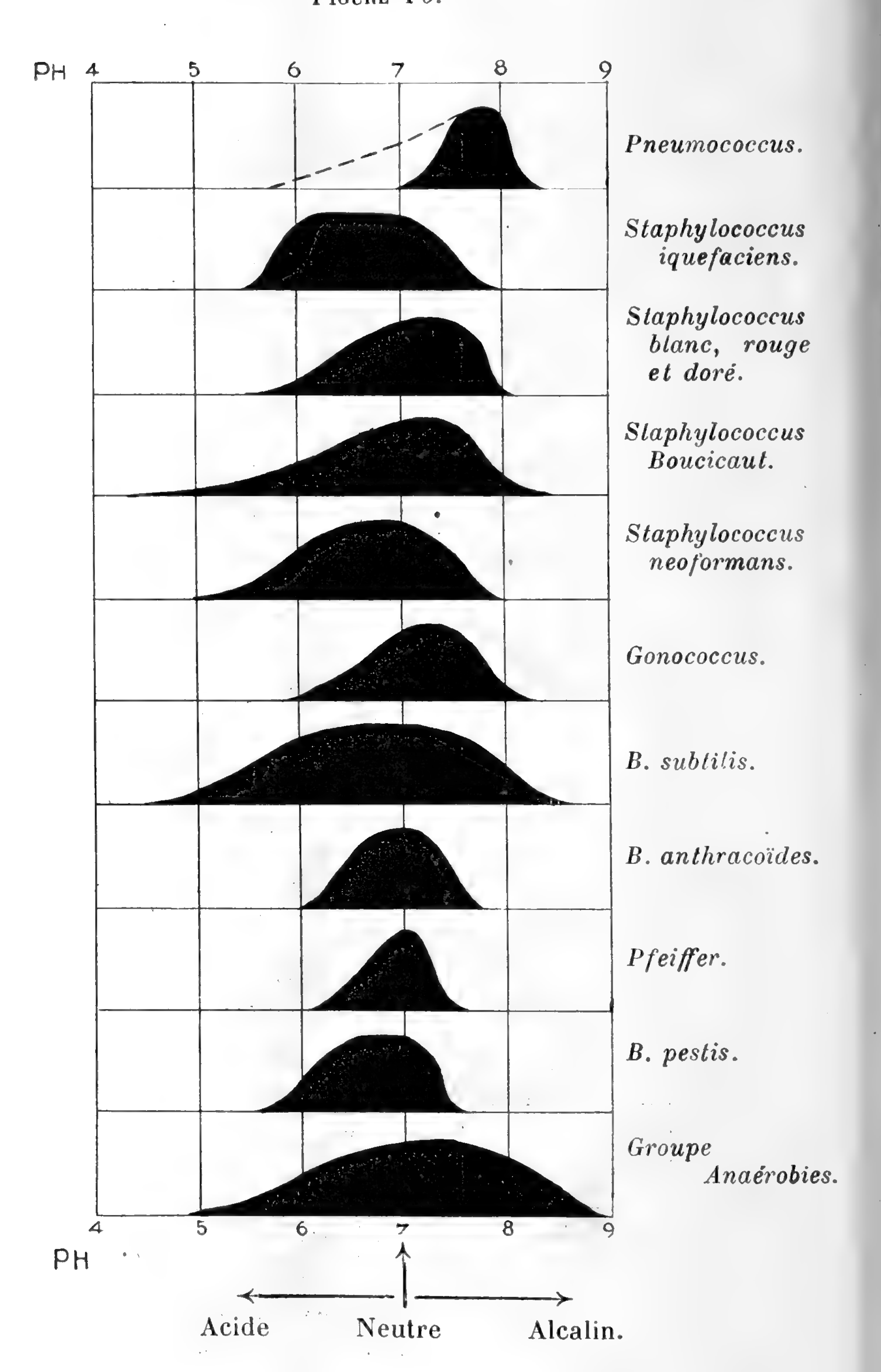


Diagramme montrant la croissance de certains micro-organismes en fonction de la concentration des ions hydrogène.

Après avoir fini ce travail, j'ai étudié, en collaboration avec M. le Dr B. Allander, la culture du bacille tétanique en relation avec les différentes concentrations des ions hydrogène et nous en avons trouvé l'optimum à pH = 7,0 — 7,6 et les limites entre pH = 5,5 et pH = 8,3.

Je veux aussi citer encore un travail de Fennel et Fischer (1919), où ils ont étudié la zone de croissance du pneumocoque en bouillon, et des *B. typhosus*, *B. para-Typhus A*, *B. para-Typhus B*, le *B. Pfeiffer*, ainsi que du *Vibrio choleræ* sur gélose. Sur gélose, la zone de croissance paraît être plus étendue que ne le montrent les résultats de mes recherches, faites sur cultures en bouillon.

Je tiens à faire encore remarquer que les valeurs de pH qui sont indiquées comme limites de la zone de croissance la restreignent à son minimum, et qu'il est bien possible que, dans certaines conditions, cette zone de croissance s'étende en dehors de ces limites.

CONCLUSIONS

1° La zone de croissance par rapport à la concentration des ions H a été étudiée pour une quarantaine de micro-organismes, dans un bouillon sans sucre (Voir tableau III).

2° Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes : 1° les bactéries supportant de grandes variations de concentration en ions H (par exemple, le *B. subtilis*, le *B. proteus*, et certains *anaérobies*) ; 2° les bactéries ne supportant que d'étroites variations. Dans ce dernier groupe se trouvent certains des plus importants micro-organismes pathogènes (par exemple, le *B. d'Eberth*, le *B. de Pfeiffer*, le *B. pestis*, le *pneumocoque*, etc.).

3° Pour les bactéries dont le développement s'opère dans une large zone de croissance, il n'est pas très important de déterminer la valeur *pH* du milieu, mais cette détermination, faite d'une manière rigoureuse, est absolument nécessaire pour celles dont la zone est étroite. D'où la nécessité de déterminer les valeurs *pH* « limites et optima » pour chaque microbe, afin

de pouvoir toujours reproduire le même milieu, et obtenir ainsi un développement microbien constant.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M. Levaditi, pour avoir mis son laboratoire à ma disposition, ainsi qu'à MM. Legroux et Dujardin-Beaumetz pour m'avoir donné les bactéries étudiées. Je veux aussi remercier mes amis et camarades MM. J. Blanc, G. Eliava, J. Jiminez, M. Rancovitch et A. Compton pour leur collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

S. H. Ayers. *Journ. Bacteriology*, 1916, **1**, p. 84.
J. Blanc. *Thèse*, Paris 1921.
J. W. M. Bunker. *Journ. Bacteriology*, 1919, **4**, p. 379.
W. M. Clark et H. A. J. Lubs. *Journ. Bacteriology*, 1917, **2**, p. 1; *Journ. Inf. Dis.*, 1915, **22**, p. 109.
S. W. Cole et J. Lloyd. *Journ. Path. Biol.*, 1917, **21**, p. 267.
G. Cullen et O. T. Avery. *Journ. exp. Med.*, 1918, **28**, p. 289; 1919, **29**, p. 215.
K. G. Dernby et O. T. Avery. *Journ. exp. Med.*, 1918, **28**, p. 345.
K. G. Dernby et H. David.
E. A. Fennel et M. B. Fischer. *Journ. Inf. Dis.*, 1919, **25**, p. 451.
K. Hedén. *Acta Dermato-Venereologica*, 1920, **1**, 198.
A. Itano. *Mass. State Agricult. Station Bull.*, 1916, p. 167.
H. Jones. *Journ. Inf. Dis.*, 1920, **16**, p. 160 et 435.
L. Michaelis. Wasserstoffionenconcentration. Berlin, 1914.
A. Ponselle. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1920, **18**, p. 1.
S. P. L. Sorensen, Enzymstudien II, *Bioch. Zeitschr.*, 1909, **21**, p. 131.
O. Svanberg. *Thèse*, Stockholm, 1918.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Mai — N° 5.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — France : 45 francs; Union postale : 55 francs. Prix d'un Numéro : 4 francs.

Secrétaire de la Rédaction : Camille RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921	......	France	45 fr.
— — — —	......	Union Postale.	55 fr.
Prix du numéro, — —	....		4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs. Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément. Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 5

Pages

Mémoires publiés à l'occasion du Jubilé de Élie Metchnikoff, réunis e[n] un volume grand in-8° de 724 pages et 20 pl. en noir et en couleurs, précédés d[u] compte rendu du Jubilé du 16 mai 1915, avec portrait de E. Metchnikoff. — Paris Masson et Cie, 50 francs.

35e ANNÉE MAI 1921 N° 5

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX DANS DU JAUNE D'ŒUF

par A. BESREDKA.

Il nous est revenu de différents côtés que la préparation du milieu à l'œuf (1) rencontre des difficultés de nature à en empêcher l'usage courant. Nous avons cherché à simplifier la technique. Le milieu que nous proposons aujourd'hui est purgé de blanc d'œuf. Il est composé uniquement de jaune d'œuf et d'eau distillée. A l'encontre de l'ancien milieu, il se prête à la stérilisation à l'autoclave. Sa préparation est simple : on bat le jaune d'œuf dans de l'eau et on alcalinise le mélange. La préparation est rapide : en quelques minutes on peut faire une large provision.

Le milieu en question a fait ses preuves : c'est à lui que nous nous adressons pour préparer l'antigène tuberculeux ; c'est encore de lui que nous nous servons quand nous avons besoin de la tuberculine, aussi pure possible, pour nos expériences.

Prenons vingt œufs. Réunissons leurs jaunes (350 cent. cubes) dans un grand verre à pied et ajoutons un litre d'eau distillée. L'eau doit être pure et avoir une réaction neutre ; dans le cas où elle serait acide, on commence par la neutraliser.

(1) Ces *Annales*, 1913, p. 1009; 1914, p. 576; *C. R. Acad. Sciences*, **156**, p. 1632, 1913.

Reste à clarifier l'émulsion au moyen d'une solution de soude à 1 p. 100. Ce temps est le plus délicat de la préparation : l'excès de soude rend le milieu impropre à la culture, le défaut de soude nuit à la transparence du milieu.

On évite ces écueils en versant d'abord une quantité de soude égale à la moitié de la quantité de jaunes réunis ; ainsi, à 350 cent. cubes de jaune on ajoute — par petites portions — 175 cent. cubes de solution de soude à 1 p. 100. On s'arrête un moment pour s'assurer du degré de la solubilisation ainsi réalisée ; puis, on procède à de petites additions de 1 à 1 cent. cube 5 de soude, en aspirant chaque fois le jaune dans une pipette. On suit de la sorte la clarification ; celle-ci est arrivée au point optimum lorsque le liquide apparaît transparent en couche mince, dans la pipette par exemple, et qu'il reste légèrement opaque en couche épaisse, vu à travers les parois du verre à pied. Une dizaine de centimètres cubes ajoutés à 175 cent. cubes précédemment versés y suffisent généralement.

Avec de l'eau distillée on complète jusqu'à obtenir — dans le cas particulier — sept litres de liquide, dans lequel le jaune est représenté dans la proportion de 1 : 20 (350 : 7.000 = 1 : 20). Le milieu est réparti en boîtes de Roux (50 à 150 cent. cubes) et stérilisé à 110° pendant vingt minutes.

Il est bon d'être prévenu que la quantité de soude nécessaire pour dissoudre le jaune d'œuf n'est pas toujours la même ; ainsi, nous avons rencontré des jaunes dont la dissolution demandait presque deux fois moins de soude que la quantité que nous venons d'indiquer.

Dans ce milieu qui ne renferme que le jaune d'œuf dissous, auquel il n'est ajouté *ni macération de viande*, *ni peptone*, *ni sel*, *ni glycérine*, les bacilles tuberculeux poussent en profondeur, sous forme de filaments blancs, extrêmement ténus.

Pour avoir des cultures riches, il y a lieu de procéder à de larges ensemencements. Dès le lendemain, on se rend compte, par une simple inspection, que la culture est en marche. De jour en jour sa richesse augmente.

Au quatrième jour, elle est assez abondante pour qu'elle puisse servir à la préparation de l'antigène en vue des réactions de fixation (1).

Vers le quinzième jour, tout le fond de la boîte de Roux se trouve tapissé d'un fin voile blanc que la moindre secousse brise et transforme en une poussière extrêmement fine. Les bacilles continuent à se développer pendant deux mois environ.

Quel que soit l'âge de la culture, il ne s'en dégage jamais cette odeur pénétrante, bien connue, que l'on rattache à la présence de la tuberculine.

(1) La préparation d'antigène est d'une grande simplicité, celui-ci n'étant autre chose qu'une culture âgée de quatre jours, stérilisée et rendue homogène par agitation. L'émulsion-mère conserve indéfiniment ses propriétés.

Dans du jaune d'œuf, les cultures, tout en restant inodores, n'en renferment pas moins de la tuberculine. Ainsi une culture de trois semaines, stérilisée et débarrassée de bacilles, tue le cobaye tuberculeux à la dose de 1,5-2 cent. cubes en moins de vingt-quatre heures ; une culture âgée de trente-cinq jours tue, dans des conditions analogues, à la dose de 1 cent. cube ; dans les cultures plus âgées (cinquante jours), la tuberculine tue à la dose de 0 c. c. 5 et rend malade le cobaye tuberculeux à celle de 0 c. c. 25 injectée dans le péritoine.

Nous nous réservons d'y revenir ; notons dès aujourd'hui que dans le milieu à l'œuf le rendement en tuberculine est comparable à celui dans du bouillon glycériné ; de plus, la préparation de la tuberculine dans ce milieu est simple et exige peu de frais.

DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANTIGÈNE TUBERCULEUX DE BESREDKA

par A. URBAIN et B. FRIED.

Il ressort de nombreuses observations faites tant sur l'homme que sur les bovidés que la réaction de fixation au moyen de l'antigène à l'œuf est généralement en plein accord avec la clinique.

Chez les tuberculeux, pulmonaires ou autres, la réaction de fixation est positive dans 90-95 p. 100 des cas; chez les non-tuberculeux, c'est-à-dire chez les sujets normaux ou atteints d'affections autres que la tuberculose, le pourcentage des résultats positifs est nul ou insignifiant.

Dès ses premières recherches, Besredka avait observé que seuls les sérums des syphilitiques offraient une exception à la règle, à savoir que l'antigène tuberculeux fixait souvent l'alexine en présence des sérums syphilitiques. Les recherches plus récentes ont montré que cette fixation prend effectivement place dans 30-35 p. 100 des sujets syphilitiques.

Rappelons qu'un certain nombre de savants [Massol (1), Rogers (2), Boquet et Nègre (3)] ont observé des cas de fixation non spécifiques, notamment en présence d'anticorps tuberculeux. Ainsi, ces auteurs ont trouvé qu'une émulsion des bacilles (diphtériques, *subtilis*, coli) ou l'extrait alcoolique (bacille diphtérique, cryptocoque) pouvaient faire office d'antigène tuberculeux, c'est-à-dire fixer l'alexine, en présence des sérums renfermant des anticorps tuberculeux.

Désirant nous rendre compte du degré de spécificité de l'anti-

(1) Cité par Calmette, L'infection bacillaire et la tuberculose, p. 460, Masson, 1920.

(2) Complement fixation in tuberculosis and a comparaison of the Wassermann et Hecht-Weinberg-Gradwohl systems. *The Journal of infectious diseases*, août 1920, 2, p. 101.

(3) Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers. *Soc. de Biol.*, 26 juin 1920.

gène à l'œuf, nous avons entrepris plusieurs séries d'expériences dont l'exposé suit :

A. — Antigènes variés non tuberculeux. Sérums tuberculeux.

Comme antigènes nous avons employé les émulsions de divers microbes :

Streptocoques (2 d'origine humaine, 1 d'origine équine).
Staphylocoques (3 d'origine humaine, 1 de mammite de brebis).
Pneumocoque II.
Bacterium coli.
Paracoli équin.
Bacille d'Eberth.
Paratyphique B.
Bacille de la morve.
Bactéridie charbonneuse.
B. subtilis.
Bacille diphtérique.

Avec ces différents microbes, il a été préparé des émulsions qui nous ont servi d'antigènes, à raison de 1 centigramme de corps microbiens pour 20 cent. cubes d'eau physiologique [procédé de Nicolle-Frasey-Debains-Nicolas (1)]. A ce taux, les émulsions fixent toujours les anticorps contenus dans les sérums correspondants. (Seuls les sérums antidiphtérique et anticharbonneux ne renferment pas d'anticorps susceptibles de dévier l'alexine en présence du bacille diphtérique et de la bactéridie).

Comme source d'anticorps, nous nous sommes adressés, d'une part, à un sérum d'un cheval immunisé avec des bacilles tuberculeux et très riche en anticorps (plus de 5.000 unités), et d'autre part, à de nombreux sérums humains provenant de sujets tuberculeux ayant donné une très forte réaction de fixation avec l'antigène à l'œuf.

En ce qui concerne la technique, nous avons suivi celle qui consiste dans l'emploi d'une dose constante d'antigène et de sérum, et de quantités variables d'alexine. Nous avons adopté, en outre, la méthode de Calmette et Massol (2) pour la numération des unités d'anticorps : si un volume v du sérum étudié

(1) Recherche sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques chez le cheval. Ces *Annales*, mai 1920.
(2) CALMETTE et MASSOL. *Soc. de Biol.*, 6 janvier 1912.

dévie N doses minima de complément, le rapport $\frac{N}{\upsilon}$ représente le nombre de doses minima de complément que peut dévier 1 cent. cube du sérum. L'unité d'anticorps correspond à la quantité de sensibilisatrice capable de dévier une dose minima d'alexine.

Les résultats obtenus avec le sérum du cheval antituberculeux et avec les sérums des chevaux normaux sont exprimés en unités d'anticorps dans le tableau suivant :

Antigènes employés	Sérum du cheval antituberculeux	Sérum des chevaux normaux.
—	—	—
Streptocoque	0 unité.	0 unité.
Staphylocoque	—	—
Méningocoque.	—	—
Pneumocoque.	—	—
Bacterium coli	—	—
Bacille d'Eberth.	—	—
Paratyphique B	—	—
Paracoli bacille équin.	—	—
Bacille de la morve.	—	—
Bactérie charbonneuse	—	—
Subtilis	—	—
Bacille diphtérique (plusieurs origines)	250 unités d'anticorps.	—

Avec les sérums humains tuberculeux, les résultats sont sensiblement comparables, sauf avec le bacille diphtérique où, seulement dans 3 cas sur 20, une fixation a été constatée, et avec le *subtilis* en présence duquel 2 sérums sur 15 examinés ont fixé le complément.

Comme on le voit, sauf des cas très rares, les antigènes non spécifiques, c'est-à-dire non tuberculeux, laissent l'alexine intacte en présence de sérums riches en anticorps tuberculeux.

B. — Antigène tuberculeux à l'œuf. Sérums variés, non tuberculeux.

Dans cette série d'expériences, nous nous sommes servis de l'antigène de Besredka, d'une part, et, d'autre part, de différents sérums thérapeutiques, antimicrobiens et antitoxiques, de l'Institut Pasteur.

Le tableau ci-après résume, en unités d'anticorps, les résultats obtenus comparativement avec le sérum de cheval immunisé au moyen de bacilles tuberculeux.

Sérums employés	Fixation	Unités en anticorps
—	—	—
Sérum de cheval antituberculeux .	Fortement positive.	5.000 unités.
— antidysentérique	Pas de fixation.	0 —
— antipesteux	—	0 —
— antiméningococcique. . . .	—	0 —
— anticharbonneux	—	0 —
— antitétanique.	—	0 —
— antipneumococcique	Fixation très légère.	25 —
— antistreptococcique	—	50 —
— antidiphtérique.	Fixation positive.	500 —
— normal (10 chevaux)	Pas de fixation.	0 —

Ici également, sauf pour la diphtérie, la réaction de fixation au moyen de l'antigène à l'œuf est restée négative avec des sérums non tuberculeux.

C. — Sérums humains.

Pour compléter ces recherches, nous nous sommes demandé comment se comportait l'antigène de Besredka au contact de sérums des sujets atteints de maladies autres que la tuberculose. Il a été examiné en tout 60 sérums (1).

a) Maladies microbiennes. — Fièvre typhoïde à la période de convalescence, 4 cas; réaction de fixation négative.

Erysipèle (16 cas) dont 6 à forme grave, en pleine évolution avec fièvre 39-40°, 9 en convalescence de deux semaines à deux mois. Parmi les convalescents, 4 avaient des érysipèles pour la troisième et quatrième fois, 1 pour la vingt-troisième fois. Chez tous ces malades la réaction fut négative.

Ostéomyélite (2 cas) : réaction de fixation négative.

En présence des résultats signalés plus haut au sujet du sérum antidiphtérique, il nous a paru particulièrement intéressant de rechercher la réaction de fixation chez les malades atteints de diphtérie.

Sur 21 sérums diphtériques (17 enfants, 4 adultes) dont les uns récemment malades (2-3 jours) et les autres convalescents, la réaction fut positive dans 5 cas (4 enfants et 1 adulte).

Cette proportion assez élevée de réactions positives nous a

(1) Nous devons ces sérums à l'extrême obligeance de MM. Auclair, Boidin, Lereboullet et Lwoff.

d'abord surpris; mais une enquête rapide ne tarda pas à nous en expliquer la cause. Chez 4 malades, dont le sérum donna une réaction positive, le sang avait été prélevé dans les trois à douze jours qui ont suivi les injections de doses massives de sérum antidiphtérique. Dans un seul cas, très grave avec paralysie, la dernière injection du sérum précédait la prise du sang de vingt-trois jours.

Il est évident que la fixation positive observée chez les diphtériques devait être attribuée surtout à la présence dans la circulation du sérum antidiphtérique, lequel, comme nous l'avons noté plus haut, possède la propriété de fixer l'alexine en présence de l'antigène tuberculeux.

b) Maladies non microbiennes. — Néphrite chronique, débilité mentale, hémiplégie, délire de négation, dépression mélancolique, alcoolisme, cancer de l'estomac, papillome, fibrome et sarcome (21 cas).

Dans tous ces cas, la réaction de fixation avec l'antigène de Besredka fut négative.

Conclusions.

1° Le sérum antituberculeux de cheval fixe au contact de l'antigène tuberculeux à l'œuf une très grande quantité d'alexine (plus de cinq mille doses). Ce même sérum, mis en présence d'autres antigènes (streptocoques, staphylocoques, pneumocoque, coli-bacille, paracoli équin, bacille d'Eberth, bacille paratyphique B, bacille de la morve, bactéridie charbonneuse, B. *subtilis*) se comporte comme un sérum normal, c'est-à-dire ne fixe pas l'alexine.

2° Les sérums des malades tuberculeux, qui fixent fortement l'alexine en présence de l'antigène tuberculeux, restent indifférents en présence des antigènes non spécifiques énumérés plus haut. Dans 3 cas seulement (sur 20 sérums) il a été noté une réaction positive en présence de l'antigène diphtérique et dans deux cas (sur 15 sérums) en présence de l'antigène fait avec le *subtilis*.

3° Les sérums des chevaux immunisés contre divers microbes et toxines, mis en présence de l'antigène tuberculeux, ne

donnent pas lieu à une réaction de fixation appréciable ; ils se comportent, en général, comme les sérums des chevaux normaux, non préparés. Seul le sérum antidiphtérique de cheval est doué d'un pouvoir fixateur notable, très inférieur cependant à celui qui est propre au sérum de cheval préparé avec des bacilles tuberculeux.

4° Les sérums des malades atteints de maladies autres que la tuberculose (fièvre typhoïde, érysipèle, néphrite, etc.) ne donnent lieu à aucune fixation en présence de l'antigène tuberculeux. Seuls les sérums des diphtériques semblent de prime abord faire une exception à la règle ; en réalité, il s'agit toujours dans ces cas de malades qui avaient reçu du sérum antidiphtérique quelques jours avant l'examen du sang.

(Institut Pasteur et Laboratoire militaire de recherches vétérinaires.)

RECHERCHES SUR LA VALEUR ANTIGÈNE DES ÉMULSIONS BACILLAIRES ET DES EXTRAITS ÉTHYLIQUES ET MÉTHYLIQUES DE BACILLES TUBERCULEUX

par L. NÈGRE et A. BOQUET.

La recherche des anticorps, dans le sérum des tuberculeux, a une importance telle, au double point de vue diagnostique et pronostique, qu'un grand nombre d'expérimentateurs se sont efforcés d'en préciser la technique et d'en perfectionner les moyens.

C'est ainsi que les antigènes les plus variés ont été successivement employés : émulsions bacillaires, tuberculines, extraits aqueux, glycérinés, peptonés, sodiques, éthérés ou alcooliques de bacilles. Parmi toutes ces préparations, l'extrait peptoné B_2 de Calmette et Massol et l'antigène à l'œuf de Besredka se sont montrés les plus actifs. Mais l'antigène B_2 ne peut être obtenu qu'au moyen d'une peptone riche en albumoses : la peptone de Witte dont il est difficile de se procurer des échantillons de composition toujours identique, et les autres peptones ne donnent pas les mêmes résultats. L'antigène à l'œuf présente l'inconvénient de ne pouvoir être conservé que pendant un très court délai.

Les extraits alcooliques de bacilles tuberculeux, qui ont l'avantage de se conserver indéfiniment, ont été préconisés par divers auteurs, en particulier par Petroff; ils ont été délaissés à cause de leur sensibilité insuffisante (extraits éthyliques) ou excessive (extraits méthyliques). Cette défectuosité paraît résulter de la technique suivie. Nous inspirant de divers travaux sur les antigènes syphilitiques, nous avons préparé un antigène spécifique très actif, d'un emploi facile, qui permet de déceler et de titrer les anticorps tuberculeux, aussi bien dans le sérum des animaux traités que dans le sérum des malades.

*
* *

Les essais de titrages qui sont exposés dans ce mémoire ont été effectués, suivant la technique de Calmette et Massol, en faisant décroître les doses d'antigène, en présence d'une dose fixe d'alexine au dixième. Nous nous sommes servis, dans toutes nos expériences, soit d'un sérum de cheval antituberculeux riche en sensibilisatrice, mis aimablement à notre disposition par M. Vallée, soit d'un sérum également très actif d'un cheval traité par des injections intraveineuses de bacilles biliés.

Le tableau ci-joint montre le dispositif général de la réaction.

Alexine au 1/10 active à 0,05	Antigène au 1/10	Sérum
—	—	—
0,3	0,1	0,5
»	0,2	»
»	0,3	»
»	0,4	»
»	0,5	»
»	0,6	»
»	0,7	»
»	0,8	»
»	0,9	»
0,05	0,9	
0,1	0,9	
0,05		0,5
0,1		0,5

Le volume total du liquide étant ramené à 3 cent. cubes dans chaque tube, les mélanges antigène, anticorps et alexine, et les tubes témoins, sont placés à l'étuve à 37° pendant une heure. On ajoute ensuite le système hémolytique : I goutte de globules de mouton lavés et 20 doses minima de sensibilisatrice hémolytique. Les tubes sont, de nouveau, laissés pendant une heure à l'étuve ; puis on lit les résultats.

La valeur de l'antigène est exprimée en nombre d'unités d'alexine, d'après le rapport

$$\frac{N}{V} = \frac{\text{nombre de doses minima d'alexine}}{\text{volume d'antigène}}.$$

Cette valeur, d'après Calmette et Massol, peut encore être établie en faisant croître les doses d'alexine en présence d'une dose fixe d'antigène et de sérum antituberculeux. Nous avons

employé les deux méthodes qui fournissent des renseignements comparables.

Émulsions de bacilles biliés.

Les bacilles tuberculeux, humides ou desséchés, employés comme antigène, ont toujours donné des résultats inconstants, à cause de l'impossibilité de préparer des émulsions parfaitement homogènes. De plus, leur pouvoir anticomplémentaire est souvent assez élevé. MM. Calmette et Guérin ont réussi à obtenir, par culture sur pomme de terre biliée, des bacilles qui jouissent de propriétés très spéciales et, en particulier, s'émulsionnent avec la plus grande facilité.

Nous avons recherché quelle pouvait être la valeur antigène de ces microbes mis en suspension dans l'eau physiologique, en opérant comme il suit : les bacilles d'une culture de trois semaines, sur pomme de terre biliée, sont récoltés à la spatule, pesés et dissociés soit au mortier avec II ou III gouttes de bile de bœuf stérile, soit dans un flacon contenant des billes de verre. On ajoute ensuite goutte à goutte l'eau physiologique en agitant constamment, puis on stérilise par chauffage pendant une heure à 80°.

Ces émulsions de bacilles biliés sont très homogènes et très stables. Leurs propriétés antigènes se conservent intactes pendant deux à trois semaines. Il suffit, avant chaque expérience, de bien agiter le liquide afin de remettre en suspension le dépôt bacillaire accumulé au fond et sur les parois des tubes.

Titrage et activité comparée des émulsions bacillaires.

Les résultats des titrages suivants, qui représentent la moyenne d'un grand nombre d'essais, sont exprimés en nombre de doses maxima d'alexine au dixième, fixées en présence de quantités constantes d'antigène et de sérum de Vallée.

	Doses minima d'alexine —
Emulsion de corps bacillaires desséchés (1 milligr. par cent. cube).	3
— de bacilles biliés	18
— de bacilles humains frais	8

Ces chiffres démontrent que les corps bacillaires desséchés, qui s'émulsionnent mal, n'étant pas mouillés par l'eau physiologique, fournissent un antigène médiocre. Les bacilles humains ou bovins frais, émulsionnés dans quelques gouttes de bile, puis dilués dans l'eau physiologique, leur sont préférables, quoique très inférieurs aux bacilles biliés.

Pour la recherche des anticorps, les émulsions de ces derniers bacilles doivent être employées à la dose de 0 c. c. 5 et au titre de 1 milligr. de corps bacillaires par centimètre cube. A cette dose, elles ne sont pas hémolytiques et n'ont aucun pouvoir anticomplémentaire.

Extraits bacillaires à l'alcool éthylique.

L'instabilité des émulsions bacillaires, la courte durée de leur conservation et leur faible activité, surtout en présence de sérums de malades, ont incité de nombreux expérimentateurs à rechercher de nouveaux antigènes d'un emploi facile et d'une plus grande sensibilité.

Kurt Meyer a été ainsi conduit à étudier les propriétés antigènes des divers extraits obtenus en faisant agir, sur les bacilles tuberculeux, un des solvants suivants : alcool, benzine, acétone, éther et éthylène trichloré. Il a constaté que les parties insolubles dans l'acétone et solubles dans l'alcool, composées de phosphatides principalement, possèdent le pouvoir fixateur le plus élevé ; et il attribua à ces phosphatides les propriétés fixatrices des bacilles tuberculeux. Les graisses, les acides gras et les cires seraient sans action, comme l'avait déjà montré Calmette.

Dans les essais de préparation d'un extrait alcoolique de bacilles tuberculeux, nous nous sommes inspirés de la technique générale indiquée par Noguchi d'abord, puis par Bordet et Ruelens, pour l'obtention d'un antigène syphilitique, et nous avons opéré ainsi qu'il suit : les bacilles tuberculeux stérilisés par le chauffage pendant une heure à 120°, lavés et desséchés à l'étuve ou sous la cloche à vide, sont mis en contact, à la température du laboratoire, avec de l'acétone à raison de 1 centigramme de corps bacillaires par centimètre cube de liquide; vingt-quatre à trente-six heures après, le mélange est

filtré sur papier, et les bacilles de nouveau desséchés à l'étuve sont traités par l'alcool à 96°, dans les mêmes proportions que précédemment. L'émulsion est fréquemment agitée. Après quarante-huit heures de contact, les microbes sont séparés par filtration. L'extrait alcoolique ainsi débarrassé des corps bacillaires constitue l'antigène tuberculeux. Dilué au dixième et employé à la dose de 1 cent. cube, cet antigène présente un pouvoir anticomplémentaire pour une dose minima active d'alexine. Pour une dilution au cinquième, ce pouvoir empêchant s'exerce avec deux doses minima d'alexine.

Les extraits alcooliques ainsi préparés sont parfaitement clairs ; ils ne donnent aucun précipité par addition d'eau. Leur limpidité n'est pas altérée par le vieillissement et leur conservation à l'abri de la lumière paraît indéfinie.

Evaporés au bain-marie, ils laissent un dépôt blanc grisâtre, insoluble dans l'eau physiologique, où ils forment, après agitation, une émulsion grossière dont le pouvoir antigène est presque nul. Repris par l'alcool à 96°, le dépôt s'y redissout complètement et récupère son activité primitive.

Les extraits alcooliques de bacilles tuberculeux contiennent, d'après les auteurs, une fraction des graisses et des cires qui ont échappé à l'action dissolvante de l'acétone, et des lipoïdes, en particulier, des phosphatides. Traités pendant vingt-quatre heures par l'éther de pétrole, qu'on sépare ensuite par filtration, ils perdent les deux tiers de leur pouvoir antigène. Leur activité, dans la réaction de déviation du complément, paraît donc bien être fonction de leur teneur en lipoïdes.

Influence du traitement préalable par l'acétone.

Les extraits acétoniques sont complètement inactifs dans la réaction de déviation du complément; nos essais confirment sur ce point les expériences de Kurt Meyer. D'autre part, leur pouvoir anticomplémentaire est nul, et, ajoutés aux extraits alcooliques à des doses variables, ils n'augmentent pas leur action empêchante sur l'alexine. Le rôle de l'acétone paraît donc consister dans une simple dissolution des produits bacillaires qui contrarient l'action extractive de l'alcool, au cours du traitement direct par ce réactif. Les produits ainsi dissous par

l'acétone consisteraient, d'après les recherches d'Agulhon et Frouin, en un mélange de matières grasses neutres, et d'acides gras libres.

Le tableau ci-après montre l'influence du traitement acétonique préalable dans l'extraction des substances antigènes par l'alcool.

	Valeur exprimée en unités d'alexine en présence de sérum de Vallée (dose : 0,5)
Extrait acétonique	0 unité.
— alcoolique direct	160 —
— — à l'appareil de Kumagawa	400 —
— obtenu par le mélange acétone-alcool	250 —
— alcoolique après traitement acétonique	833 à 1.000

Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers.

Les antigènes extraits de différents microbes, suivant la technique précédemment indiquée, titrés en présence du même sérum antituberculeux ont fourni les résultats suivants :

	Valeur exprimée en unités d'alexine en présence de sérum de Vallée (dose : 0,5)
Extraits alcooliques de bacilles humains et bovins	833 à 1.000 unités.
— — aviaires	450
— — pisciaires	400
— — paratuberc. (Korn)	375
— — paratuberculeux (Grassberger)	333
— — diphtériques	800 à 1.000
— — de cryptocoques	50
— — de pneumocoques	0

Les bacilles tuberculeux aviaires et pisciaires et les bacilles paratuberculeux sont beaucoup moins riches en antigènes que les bacilles humains et bovins.

Les extraits de bacilles diphtériques fixent les anticorps tuberculeux comme les extraits de bacilles de Koch. L. Massol avait déjà fait une semblable constatation et montré que les bacilles diphtériques se comportent comme les bacilles tuberculeux dans la réaction de Bordet-Gengou. Cet expérimentateur attribuait ces résultats à des composants chimiques com-

muns aux deux microbes, et nous verrons, dans les chapitres suivants, que le pouvoir antigène des bacilles diphtériques, comme celui des bacilles tuberculeux, paraît être proportionnel à leur teneur en phosphatides.

Les extraits d'un champignon pathogène : le cryptocoque de la lymphangite épizootique, sont faiblement actifs.

Rogers a obtenu 25 p. 100 de réactions de déviation positives avec des sérums antituberculeux et des émulsions de produits lépreux, 37 p. 100 avec des émulsions de grassbacilles, 30 p. 100 avec le bacille du smegma, 24 p. 100 avec le staphylocoque et 8 p. 100 avec le *Bacillus coli*.

D'après Petroff, tous les bacilles acido-résistants donnent des extraits sodiques actifs dans la réaction de fixation des anticorps tuberculeux.

Les extraits de pneumocoques, qui d'ailleurs sont très pauvres en phosphatides, donnent des réactions de fixation constamment négatives, en présence de sérums antituberculeux.

Il résulte de ces expériences que les substances permettant d'obtenir une réaction de déviation positive, en présence des sérums antituberculeux, ne sont pas exclusivement contenues dans les bacilles de Koch. Toutefois, les différences observées sont nettement en faveur des bacilles humains et des bacilles bovins, ainsi que des bacilles diphtériques qui se comportent de façon à peu près identique, avec une légère supériorité pour les bacilles humains.

Relations entre le pouvoir antigène des tuberculines et des extraits éthyliques bacillaires.

On sait, d'après plusieurs auteurs, que la tuberculine brute peut être employée comme antigène, mais que la tuberculine précipitée par l'alcool ne peut servir à cet usage (Calmette et Massol). Il était intéressant de rechercher si le liquide, séparé de son précipité, après traitement de la tuberculine brute par l'alcool absolu, conservait le pouvoir de fixer l'alexine en présence des sérums antituberculeux. Le résultat des essais effectués dans ce but fut complètement négatif. D'autre part l'activité des extraits alcooliques de bacilles privés de leur tuberculine n'est que faiblement diminuée, comparativement aux extraits

de bacilles totaux. L'épuisement des microbes à chaud, dans le bouillon glycériné — en quoi consiste la préparation de la tuberculine — n'enlève donc pas leurs substances antigènes. Cependant, à la suite d'une macération prolongée, à 65°, des bacilles tuberculeux dans une solution concentrée (10 p. 100) de peptone de Witte riche en albumoses, ces mêmes substances se dissolvent. Le liquide, séparé par filtration de la masse bacillaire, acquiert ainsi un pouvoir fixateur spécifique comparable à celui des extraits les plus actifs. C'est l'antigène B^2 de Calmette et Massol.

L'antigène de Besredka, qui donne également d'excellents résultats dans la recherche des anticorps tuberculeux, est préparé au moyen de cultures de bacilles de Koch dans du bouillon de viande additionné de jaune et de blanc d'œuf. L'expérience nous a montré que sa seule partie active, dans la déviation du complément, était constituée par le liquide décanté après une centrifugation prolongée : une même quantité d'antigène total et d'antigène centrifugé, titrée au moyen du sérum de Vallée, fixe le même nombre de doses d'alexine. Le culot bacillaire, remis en émulsion dans une quantité d'eau physiologique égale à la quantité primitive, dévie très faiblement le complément (2 doses minima d'alexine, au lieu de 16 pour l'antigène total). L'antigène de Besredka ne doit donc ses propriétés ni aux microbes qu'il contient en suspension ni, d'après les observations faites au début de ce chapitre, à la tuberculine qu'il renferme. Il se comporte comme un extrait bacillaire.

Les extraits alcooliques de bacilles de Koch injectés aux animaux tuberculeux ne provoquent aucun trouble. Un cheval, réagissant fortement à la sous-cuti-tuberculination, a supporté sans inconvénient 2 cent. cubes d'extrait méthylique, et l'injection intraveineuse de 20 cent. cubes d'extrait éthylique à une vache tuberculeuse n'a déterminé aucune hyperthermie.

Spécificité du pouvoir antigène des extraits éthyliques bacillaires.

Les extraits éthyliques de bacilles tuberculeux ne dévient pas l'alexine en présence de sérums normaux (homme, cheval,

chien, bœuf), ni en présence de sérums provenant d'individus atteints de maladies autres que la tuberculose. Toutefois, les sérums très riches en anticorps syphilitiques peuvent donner une réaction positive avec l'antigène tuberculeux. Cet inconvénient paraît d'ailleurs commun à tous les extraits bacillaires, quel qu'en soit le mode de préparation.

Aucune déviation n'a été obtenue avec le sérum d'enfants atteints de diphtérie, ni avec les sérums d'animaux producteurs d'antitoxine diphtérique. Résultats également négatifs avec les sérums thérapeutiques suivants : antitétanique, antidysentérique, antiméningococcique, antistreptococcique, antipesteux, et antispirochétosique.

Essais avec le sérum des sujets suspects de tuberculose ou cliniquement tuberculeux.

La recherche des anticorps dans le sérum des tuberculeux, au moyen de l'antigène éthylique, n'a pas donné de résultats aussi satisfaisants que les expériences faites avec le sérum des animaux préparés permettaient de l'espérer. Tantôt cet antigène se comporte comme l'antigène B^2 de Calmette et Massol ou l'antigène de Besredka, et dévie des quantités égales d'alexine en présence d'anticorps tuberculeux, tantôt, au contraire, il se montre complètement inactif, alors que les deux autres antigènes fixent, avec les mêmes sérums, des doses parfois élevées d'alexine.

Cette inégale activité de l'antigène éthylique restreignait considérablement son emploi. Nous avons alors essayé de le rendre plus sensible en augmentant sa concentration en corps bacillaires : 2 et 5 centigrammes de bacilles desséchés par centimètre cube d'alcool, au lieu de 1 centigramme. Mais il en résulte un accroissement du pouvoir anticomplémentaire tel que ces extraits deviennent pratiquement inutilisables.

La prolongation de la durée de la macération (douze jours au lieu de deux jours) à la température de l'étuve (37-38°) agit plus favorablement. L'antigène ainsi préparé est beaucoup plus actif, et son titre atteint 3.000 unités au lieu de 1.000. Néanmoins sa sensibilité n'est pas notablement augmentée.

Il convenait donc d'abandonner l'alcool éthylique dans la

préparation des extraits et de lui substituer un meilleur solvant des lipoïdes bacillaires, qui paraissent constituer, comme nous le montrerons dans les chapitres suivants, les véritables substances actives des antigènes tuberculeux.

Extraits bacillaires à l'alcool méthylique.

Pétroff, qui a particulièrement étudié les extraits de bacilles de Koch, a préconisé l'antigène ainsi préparé : 250 milligrammes de bacilles tuberculeux secs et pulvérisés sont traités par 50 cent. cubes d'alcool méthylique pendant cinq à dix jours à 38°, puis la macération est conservée à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière. Après plusieurs semaines, le liquide surnageant est décanté et réparti en ampoules scellées ou en flacons bien bouchés, à cause du pouvoir absorbant de l'alcool méthylique vis-à-vis de l'eau. Au moment de l'emploi l'extrait est dilué dans l'eau physiologique.

Cet antigène, largement utilisé dans l'armée américaine, aurait, d'après Pétroff, l'inconvénient de donner des réactions de fixation positive dans les cas de tuberculose éteinte ou occulte.

Nous avons essayé de remédier à cette défectuosité en appliquant aux extraits méthyliques bacillaires la technique employée pour la préparation des extraits éthyliques :

Des bacilles humains et bovins, provenant de cultures sur bouillon glycériné, âgées de 6 semaines, sont stérilisés par un chauffage de trente minutes à 120°, filtrés sur papier et mélangés à parties égales. Les corps bacillaires sont ensuite lavés sur le filtre à l'eau distillée, puis desséchés à l'étuve ou dans la cloche à vide. Les microbes secs sont traités par de l'acétone pendant vingt-quatre heures (1 cent. cube d'acétone par centigramme de bacilles), desséchés de nouveau, et finalement mis à macérer dans l'alcool méthylique à 99° (1) (1 cent. cube d'alcool par centigramme de bacilles). On laisse en contact pendant dix à douze jours à 37-38°, en agitant fréquemment. Le liquide, séparé par filtration du dépôt microbien, constitue l'antigène tuberculeux que nous employons à la dose de un vingtième de centimètre cube, soit 1 cent. cube de la dilution

(1) Il est indispensable d'employer de l'alcool méthylique à 99°; l'action dissolvante des alcools à titre plus faible étant presque nulle.

au vingtième dans l'eau physiologique. Le pouvoir empêchant de cette dilution est nul en présence de la dose minima active d'alexine.

Les extraits méthyliques, conservés suivant les indications de Pétroff, fournissent à froid un précipité assez abondant qui se dépose sous la forme de petites masses blanches. Ce précipité se redissout entièrement lorsque le liquide est porté à 45 50°.

Au moment de l'emploi l'antigène, rendu limpide par un séjour de quelques minutes à l'étuve, ou au bain-marie à 50°, est additionné d'abord goutte à goutte, puis plus rapidement, d'eau physiologique dans les proportions indiquées. L'émulsion ainsi obtenue a le même aspect et la même homogénéité qu'une émulsion aqueuse de lécithine au 1/10.000 environ. Pour éviter les échecs, il est indispensable de se conformer à cette technique.

Titrage de l'antigène méthylique.

Ce titrage a été effectué au moyen d'un sérum antituberculeux de cheval, d'après les méthodes de Calmette et Massol précédemment exposées :

1° En faisant décroître les quantités d'antigène en présence d'une dose fixe de sérum antituberculeux et d'alexine. Le rapport $\frac{N}{V}$ ainsi déterminé indique une valeur de 3.000 unités, à la fois pour l'antigène méthylique et l'antigène éthylique préparé dans les mêmes conditions.

2° En faisant croître les quantités d'alexine en présence de doses fixes de sérum de Vallée et d'antigène. Le rapport $\frac{N}{V} = 60$ pour l'antigène méthylique, et 30 seulement pour l'antigène éthylique. Le pouvoir fixateur de l'extrait méthylique est donc double du pouvoir fixateur de l'extrait éthylique. Comparés, à ce même point de vue, les extraits méthyliques et l'antigène de Besredka se comportent de façon identique.

Dosage des phosphatides des extraits éthylique et méthylique bacillaires par la méthode de réactivation du venin de cobra.

Il était intéressant de rechercher si l'alcool méthylique, solvant des lécithines, lorsqu'il est complètement déshydraté,

entraîne avec lui les substances du même groupe que contiennent les bacilles de Koch, et dans quelle mesure l'activité antigènes est fonction de leur teneur en phosphatides.

Nous avons appliqué, à cet effet, la méthode de réactivation du venin de cobra de Calmette et Massol qui — l'action des acides gras ne pouvant être retenue dans les conditions de l'expérience — permet d'effectuer un dosage précis de ces substances, par comparaison avec une solution titrée de lécithine. La technique suivie est indiquée par le tableau ci-après :

Solution de venin au 1/500	Globules de cheval au 1/20	Extrait éthylique de bacilles tuberculeux au 1/10	Résultats	Lécithine au 1/10.000	Résultats
—	—	—	—	—	—
1 c. c.	1 c. c.	0,1	0	0,02	0
		0,2	0	0,05	H
		0,3	H	0,1	H
		0,4	H	0,2	»
		0,5	H	0,3	»
		0,6	H	0,4	»
		0,7	H	0,5	»
		0,8	H	0,6	»
		0,9	H	0,7	»
		1	H	0,8	»
				0,9	»

Le volume du liquide est complété, avec de l'eau physiologique, à 3 cent. cubes dans tous les tubes, puis les mélanges sont portés à l'étuve à 37°, et on lit les résultats au bout d'une demi-heure.

Le précédent titrage montre que 1 cent. cube de l'extrait éthylique bacillaire correspond, dans la réactivation du venin de cobra, à 0 gr. 00002 de lécithine (lécithine pure de l'œuf).

L'extrait méthylique des mêmes bacilles est 5 fois plus riche en phosphatides : 1 cent. cube équivaut à 0 gr. 0001 de lécithine.

Les extraits éthyliques de bacilles diphtériques, qui fournissent une réaction de fixation positive avec les sérums antituberculeux, ont la même teneur en phosphatides que les extraits méthyliques de bacilles de Koch. Ceux des bacilles paratuberculeux en renferment un peu moins, et les microbes, comme le pneumocoque, qui sont inactifs en présence de sérums antituberculeux, ne donnent aucune hémolyse avec le venin de cobra.

Il semble donc que les phosphatides, dissous dans les extraits bacillaires, jouent, comme le pensait K. Meyer, un rôle fondamental dans la réaction de déviation du complément. Cependant, les solutions d'ovolécithine n'ont aucun pouvoir antigène, et l'addition de cette substance aux extraits alcooliques de bacilles tuberculeux n'augmente pas leur activité.

Activité et sensibilité comparée des divers antigènes.

Un bon antigène doit déceler la totalité des anticorps contenus dans un sérum, et donner une réaction positive pour la plus faible trace de la sensibilisatrice correspondante. Sa valeur et celle des anticorps se mesure au nombre de doses d'alexine fixées rapporté à l'unité de volume. Les résultats du titrage comparatif des différents antigènes sont indiqués dans les tableaux suivants :

A. Titrage des anticorps contenus dans 0 c. c. 5 d'un échantillon de sérum de Vallée, en présence d'un excès d'antigène tuberculeux.

B. Titrage comparé des anticorps contenus dans 0 c. c. 3 de sérums de tuberculeux ou suspects.

	Nombre de doses minima d'alexine fixée	Quantité d'antigène (c. c.)
Extrait éthylique direct	8	0,1
Emulsion de bacilles biliés (1 mmg par c. c.)	36	1
Extrait peptoné aqueux	40	0,1
— éthylique après traitement acétonique	40	0,1
— méthylique	60	0,1
Antigène de Besredka	60	0,3

N° des sérums	Nombre de doses minima d'alexine fixées avec : Extrait méthylique	Antigène de Besredka
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	4	4
5	0	0
6	5	5
7	5	5
8	0	0
9	5	5
10	5	4

Application de l'extrait méthylique a la recherche des anticorps dans le sérum des tuberculeux.

La recherche des anticorps dans le sérum des malades a été effectuée d'après la technique suivante :

A 0 c. c. 3, par tube, de sérum on ajoute 0 c. c. 5 d'antigène au dixième et des doses d'alexine au quinzième croissant de 0,1 à 0,5; puis on complète à 2 c. c. 5 avec de l'eau physiologique. Après une heure de contact à 37°, on ajoute le système hémolytique (20 doses de sensibilisatrice antimouton et 1 goutte de globules de mouton). Contact à 37° pendant trois quarts d'heure, puis lecture des résultats.

L'alexine est, au préalable, titrée. Trois tubes témoins additionnés de doses croissantes d'alexine sont nécessaires pour le titrage du pouvoir anticomplémentaire du sérum et de l'antigène seuls.

Sur 90 sérums humains provenant d'individus suspects de tuberculose, 41 ont fourni une réaction positive, soit 45 p. 100. La proportion des résultats positifs, à des taux d'alexine variant de 2 à 5 doses minima, s'est élevée, pour les tuberculeux en évolution, à 95 p. 100 (57 sur 60 examinés).

Conclusions.

Les antigènes, obtenus en faisant agir successivement l'acétone et l'alcool méthylique à 99° sur les bacilles tuberculeux, se sont montrés rigoureusement spécifiques. Exceptionnellement ils dévient l'alexine avec certains sérums de syphilitiques. Il est possible que, dans ces cas, la sensibilisatrice décelée soit non d'origine syphilitique, mais d'origine tuberculeuse.

Leur sensibilité est très grande ; comme l'antigène peptoné de Calmette et Massol et comme l'antigène à l'œuf de Besredka, ils fournissent une réaction positive avec le sérum des tuberculeux, même en présence de très faibles quantités d'anticorps. Ils offrent l'avantage d'une préparation facile et d'une conservation indéfinie, à la condition d'être tenus à l'abri de l'humidité, de l'air et de la lumière.

L'inaltérabilité des extraits méthyliques bacillaires et la

fixité de leur composition permettront d'étudier, chez les malades, dans des conditions expérimentales toujours identiques, l'évolution des anticorps, d'en effectuer le titrage avec précision, et de déterminer l'importance de leurs variations dans le pronostic de la tuberculose.

(Laboratoire du professeur Calmette, à l'Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

H. Agulhon et A. Frouin, Etudes sur les matières grasses du bacille tuberculeux. *Bull. Soc. chimie biol.*, novembre, décembre 1919, **1**, n° 4.

Besredka. Ces *Annales*, 1914, p. 428, novembre 1913.

A. Boquet et L. Nègre, Valeur antigène des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et des émulsions de bacilles tuberculeux biliés. Section d'études scientifiques de l'œuvre de la tuberculose, séance du 12 juin 1920, in *Revue de la tuberculose*, 1920, **1**, n° 4.

— Mode de préparation et pouvoir antigène des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 19 juin 1920, **83**, p. 922.

Bordet et Rulens, L'antigène syphilitique de l'Institut Pasteur de Bruxelles. *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, p. 880.

A. Calmette, L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Masson et Cie, éditeurs, Paris, 1920.

A. Calmette et L. Massol, Les anticorps tuberculeux et leur rôle dans la défense de l'organisme contre l'infection tuberculeuse. *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1916, p. 33, 65, 97.

A. Calmette, Massol et Breton. *C. R. Acad. des Sciences*, 30 mars 1908.

A. Goris, Composition chimique du bacille tuberculeux. Ces *Annales*, août 1920, **34**, p. 497.

Kurt Meyer, Sur les composantes fixatrices du complément chez le bacille tuberculeux, *Zeitsch. für Immunitätsforschung*, 1912, **14**, f. 3.

Massol et Grysez. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **77**, p. 428.

L. Nègre et A. Boquet, Valeur antigène comparative des extraits alcooliques de bacilles tuberculeux et de microbes divers. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 26 juin 1920, **83**, p. 960.

— Sur le pouvoir antigène des extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 15 janvier 1921, **84**.

Noguchi. *Journ. of exper. med.*, 1909, **11**.

S. A. Petroff, Serological studies in tuberculosis. *Amer. review of tuberculosis*, mars 1917, **1**, n° 1.

— Serological studies on tuberculosis. Second contribution, further observations on complement fixation. *Amer. review of tuberculosis*, janvier 1920, **3**, n° 11.

J.-B. Rogers, Fixation du complément dans la tuberculose et comparaison des méthodes de Wassermann et de Hecht-Weinberg-Gradwohl. *Journ. of infectious diseases*, août 1920, **27**, n° 2, p. 101.

RECHERCHES SUR LA THÉORIE DE L'ANAPHYLAXIE

par le Professeur Ernest PESCI,
docente nella R. Università di Torino,
vice primario dell'ospedale Maggiore di San Giovanni.

Ce travail a été le sujet d'une communication
au Congrès international de Physiologie, Paris 16-20 juillet 1920.

(Travail de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Turin.)

Rapports entre la protéolyse et l'anaphylaxie.

Mes nombreuses expériences peuvent être divisées en quatre groupes :

a) Les cobayes mis à un régime monophagique de lait ou d'œufs présentent une réaction prononcée à la ninhydrine, mais jamais des réactions d'anaphylaxie.

b) Les cobayes préparés par des injections de la paroi interne de kystes hydatiques présentent constamment la réaction d'anaphylaxie et presque jamais la réaction d'Abderhalden.

c) Les cobayes préparés par des injections de blanc d'œuf présentent la réaction d'Abderhalden et celle d'anaphylaxie avec persistance de la dernière, alors que la première disparaît.

d) Les cobayes traités par le blanc d'œuf comme les précédents présentent, pendant une première période, la réaction d'Abderhalden, mais non celle de l'anaphylaxie passive, tandis que plus tard les deux réactions donnent des résultats inverses.

Notons de suite que chez cinq cobayes, qui présentaient la protéolyse et l'anaphylaxie active très prononcée, la réaction protéolytique, contrôlée une demi-heure après le choc, n'était pas modifiée.

Les ferments protéolytiques et les antialbumines anaphylactiques représentent deux manières diverses de réaction contre l'antigène. Les deux réactions se développent indépendamment l'une de l'autre : elles peuvent coexister pendant la première période ; une des réactions peut être présente et l'autre peut

faire défaut. Dans la période finale, l'anaphylaxie persiste tandis que la protéolyse est déjà éteinte.

Donc, si le même sérum provenant de la même saignée du même animal ne présente pas la réaction à la ninhydrine, tout en transmettant l'anaphylaxie passive, il s'ensuit que les ferments protélytiques représentent une fonction différente de celle des antialbumines anaphylactiques : on peut donc affirmer que la crise anaphylactique n'est pas en rapport avec la digestion parentérale de l'antigène.

Rapports entre l'anaphylaxie et les plaquettes.

Des numérations des plaquettes chez quatre cobayes normaux ont donné des chiffres variant entre 400.000 et 500.000 par millimètre cube. Les hématies sont de 5 millions à 5 millions et demi par millimètre cube. Le rapport normal entre plaquettes et hématies oscille entre 1:10 à 1:14. Le jeûne n'exerce aucune influence sur le nombre des plaquettes ni des hématies.

La chute du nombre des plaquettes est énorme immédiatement après le choc anaphylactique ; ce nombre tombe à 28.000, ce qui donne le rapport de P/H = 1:163. Les contours et le diamètre des plaquettes après le choc paraissent plus irréguliers.

J'ai constaté les mêmes résultats après le choc anaphylactoïde produit par la peptone Witte. La diminution du nombre des plaquettes est proportionnelle à la gravité du choc ; le nombre redevient normal 36-48 heures après l'injection déchaînante.

Rapport entre le choc anaphylactique et les caractères physiques des sérums.

Plusieurs substances ont été employées pour supprimer le choc. Parmi ces dernières il y en a qui abaissent la tension superficielle, et d'autres qui l'augmentent. J'ai constaté une forte augmentation de la tension superficielle chez le lapin et le cobaye à la suite de l'injection de $CaCl^2$ à 1 p. 100.

Je me suis demandé quel est le mécanisme de l'action antianaphylactique de l'oléate de soude et des sels biliaires, lesquels abaissent la tension superficielle, et d'autre part, celui de

$CaCl^2$ qui agit de même, tout en augmentant la tension. Je suppose que l'acidité ou l'alcalinité du plasma, c'est-à-dire la concentration des ions hydrogène et par conséquent la modification de la charge électrique de contact jouent un rôle important. L'oléate de soude est un savon qui agit en vertu de son action hydrolytique.

On sait que l'oléate de soude et les sels biliaires sont des savons d'acides faibles, qui, dissous dans l'eau, abaissent la tension superficielle, et se dissocient par hydrolyse en Na^+ et un radical acide (R^-). On sait que ce radical se combine avec l'H pour former un acide non dissociable. Je suppose qu'il y a une soustraction d'H^+ ions, ce qui a pour effet, pendant quelque temps, un excès dans le sang circulant de OH^- ions ; l'alcalinité du plasma augmente, ce qui entraîne le ralentissement de la réaction anaphylactique suivante.

Dans la supposition que c'est la plus grande alcalinité qui soit la cause de la suppression du choc, j'ai injecté 8 cent. cubes de solution N/100 de NaOH dans le liquide de Ringer privé du $CaCl^2$ à des cobayes dix minutes avant l'injection déchaînante ; j'ai réussi à supprimer ainsi le choc anaphylactoïde et anaphylactique. J'ai répété les mêmes expériences avec la solution N/100 de HCl dans le liquide de Ringer privé du $CaCl^2$; le syndrome anaphylactique et anaphylactoïde se déroulèrent avec les phénomènes bien connus. Donc un excès d'acide, s'il n'est pas favorable, n'empêche pas en tout cas le choc anaphylactique.

Il reste encore à savoir si les substances antianaphylactiques modifient momentanément les conditions de réaction ou si elles transforment profondément les colloïdes participant à la réaction ? L'hypothèse, qui me paraît la plus logique, est qu'il se produit un changement de la charge électrique sans modification des affinités chimiques. L'action antianaphylactique de l'oléate de soude, sur lequel j'ai expérimenté, est d'une plus courte durée que celle de l'injection déchaînante.

Caractères de l'anaphylaxie en comparaison avec ceux des phénomènes anaphylactoïdes.

Les tableaux du choc anaphylactique et anaphylactoïde sont identiques, mais l'origine des phénomènes est essentiellement

différente. L'antigène anaphylactique peut être introduit à la dose d'un centigramme et pendant un certain laps de temps il provoque des intermédiaires dans l'organisme, jusqu'à ce que l'injection déchaînante puisse déterminer le choc. Dans le choc anaphylactoïde, l'incubation n'est pas nécessaire, et il faut par contre employer des doses élevées. Il est donc manifeste que dans la pathogénie de l'anaphylaxie il existe une première période d'élaboration pendant laquelle une modification spéciale des colloïdes introduits a lieu silencieusement. Ces colloïdes conservent leur stabilité dans le complexe normal du plasma, jusqu'à ce que, sous l'influence de l'injection déchaînante, la labilité caractéristique du système se révèle.

La première dose d'antigène reste quelque temps dans l'organisme avant d'être désintégrée complètement. Dans une première phase, l'antigène doit passer par des transformations progressives, jusqu'à ce qu'il soit par certains caractères rapproché de la structure des colloïdes normaux et graduellement assimilé. L'antigène subit une métatipie, mais tout en conservant quelques-uns de ses caractères primitifs.

Dans la deuxième phase, l'antigène métamorphosé va remplacer un groupement colloïdal normal dans l'intérieur de la cellule. Par conséquent, la cellule finit par imprimer un nouveau caractère à ses colloïdes vivants. Mais ce qui importe, c'est que, stimulée par le nouveau produit dérivé de l'antigène, la cellule continue à fabriquer, par synthèse, des groupements colloïdaux identiques ; cette production autochtone dure pendant toute la période anaphylactique.

On comprend que des injections préparantes plus fortes ou des injections répétées produisent un grand nombre de colloïdes de réaction et par conséquent une sensibilité anaphylactique plus exquise. Après un certain laps de temps, les cellules, et en conséquence le plasma, contiennent des colloïdes sessiles et des colloïdes transmissibles passivement. Ces colloïdes conservent une telle affinité pour l'antigène primitif que, lors de l'injection déchaînante, il se produit des phénomènes d'attraction et de floculation, qui représentent le *primum movens* de la réaction anaphylactique.

La première attraction serait due à l'affinité physico-chimique. Les altérations qui suivent immédiatement représentent seule-

ment des changements d'état physique, elles appartiennent aux deux réactions anaphylactique et anaphylactoïde. On sait que les phénomènes chimiques entre les colloïdes sont très lents : les modifications exercées par l'antigène sur les colloïdes de réaction sont instantanées ; elles doivent donc être de nature physique.

Mécanisme du choc anaphylactique.

Les phénomènes de floculation anaphylactique représentent une réaction qui s'accomplit dans les humeurs et au sein des cellules. La floculation dans les humeurs donne lieu au choc. On sait pourtant que les organes, qui sont les plus touchés au cours de la crise anaphylactique, sont les poumons chez le cobaye, la peau chez l'homme, l'intestin et les reins chez le chien. Le cerveau n'est presque pas atteint. Les tissus qui sont les plus atteints par les produits de réaction favorisent *in situ* l'obstruction des capillaires par des thrombus. C'est là qu'il faut chercher l'explication du phénomène d'Arthus et la raison pour laquelle une injection d'extrait de pollens détermine un asthme de foin.

On comprend que l'on ait trouvé dans le sérum un accroissement remarquable de l'azote aminé pendant le choc et que dans la période suivante on trouve une formidable élimination d'azote urinaire : les albumines floculées subissent en grande partie une combustion rapide.

Si je dois résumer les diverses phases de la réaction anaphylactique, je résumerai ma théorie par le schéma suivant :

1re Phase. — L'antigène, après la première introduction dans le sang, est modifié graduellement, jusqu'à ce qu'il devienne partie intégrante des colloïdes vivants et leur imprime un caractère nouveau, notamment une affinité particulière pour l'antigène primitif.

2e Phase. — Les cellules, stimulées par le nouveau produit dérivé de l'antigène, fabriquent par synthèse des albumines identiques au nouveau produit avec la même affinité physico-chimique pour l'antigène primitif. Ces nouveaux produits sont abondants dans le plasma et dans certains tissus.

3e Phase. — L'antigène introduit lors de l'injection déchaînante réagit avec les colloïdes modifiés, il les flocule, d'où la crise anaphylactique. La floculation intravasculaire donne lieu à des conglomérats de plaquettes et à des embolies capillaires, d'où le choc foudroyant. La floculation intracellulaire donne lieu à une commotion cellulaire, aggrave le choc et favorise *in situ* des obstructions capillaires, suivies des réactions générales et locales.

Les syndromes du choc anaphylactique et anaphylactoïde sont identiques, mais ils ont une pathogénie différente. Dans les réactions anaphylactoïdes nous n'avons pas besoin d'une période d'incubation pour la formation des intermédiaires, les phénomènes se développent de la même façon par floculation. Il y a une différence de degré : la réaction d'anaphylaxie est beaucoup plus sensible.

Turin, 14 octobre 1920.

SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS SUR LA CELLULE

par le Dr Serge TCHAHOTINE.

On sait que l'application de l'énergie rayonnante dans les recherches de biologie expérimentale a acquis aujourd'hui une grande importance : on connaît les phénomènes vitaux, dus à l'action photochimique de la lumière, comme l'assimilation de CO^2 par les plantes, les réactions rétiniennes dans la vision, on a établi que les divers rayonnements ultra-violets, de Röntgen, du radium, et même des rayons visibles en milieu sensibilisé par certaines substances dites photodynamiques ont un pouvoir fortement irritant, même mortifiant : on connaît l'action purificatrice des lampes à mercure sur l'eau potable, et qui est appliqué maintenant en grande échelle par les municipalités, on connaît enfin l'application des rayons du radium et de Röntgen dans la thérapeutique du cancer, des rayons ultra-violets dans diverses maladies de la peau et les ulcères (méthode de Finsen), etc. D'autre part, dans le domaine des sciences physiques et chimiques, l'étude des radiations, au point de vue photochimique, a pris aussi, pendant les dernières années, une large extension. C'est pourquoi le problème du mécanisme ou chimisme intime de l'action des rayonnements présente un haut degré d'importance en même temps théorique et pratique.

En 1912, au cours de mes recherches sur la cytologie expérimentale, je suis parvenu à élaborer une nouvelle méthode de micro-vivisection, que j'ai appelée la méthode de radio-piqûre microscopique (1). Elle consiste en ce que sur un point voulu d'une seule cellule isolée — à sa périphérie ou à l'intérieur, par

(1) Tschachotin, Die mikrokopische Strahlstichmedode, *Biol. Centralbl.*, 1912, **33**, p. 623.— Tchahotine, La radiopuncture microscopique. *C. R. Acad. des Sciences*, 1920, séance du 13 décembre 1920.

exemple sur le noyau seul (1) — j'applique un faisceau extrêmement fin de rayons ultra-violets, un dard microscopique rayonnant, qui me permet de localiser expérimentalement la mortification ou l'irritation d'un élément quelconque constitutif de la cellule.

Dès le début de mes recherches, je me suis heurté à certaines difficultés, qui m'ont contraint d'aborder la question du mécanisme de l'action des rayonnements sur la matière vivante. Mes premières recherches (2) sur cette question en 1912-14, malheureusement interrompues par la guerre, m'ont amené à croire, au début, que nous nous trouvions en présence, surtout en premier lieu, d'une action des rayons sur le cytoplasme de la cellule. On connaît les recherches de V. Henri (3) et de ses collaborateurs sur le pouvoir abiotique de ces rayons, qui ont montré d'une part un haut pouvoir absorbant du cytoplasme et des matières protéiques pour ces rayons, d'autre part leur grande toxicité pour les organismes unicellulaires et les cellules isolées des Métazoaires, ainsi que leur pouvoir coagulant sur les colloïdes. Une hypothèse considère l'action des rayonnements comme due à la destruction dans la cellule de certains enzymes, une autre envisage leur action réductrice, une troisième encore croit que ce sont spécialement les composés lécithiques, qui sont désagrégés avant tout par ces rayons. Cette dernière hypothèse, émise par Schwarz et soutenue par Werner, est intéressante, parce qu'elle se base sur le fait que ce sont surtout les cellules riches en lécithides, comme par exemple les œufs, les cellules cancéreuses, qui sont plus sensibles. En poursuivant cet ordre d'idées, on s'est demandé ce qui résulterait de la désagrégation photochimique de la lécithine, et on vit facilement apparaître, comme un des produits de cette démolition, la choline. Le fait intéressant est, que Werner (4) a réussi à

(1) Tchahotine, Action localisée des rayons ultra-violets sur le noyau de la cellule par moyen de la radio-piqûre microscopique, 1920. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, p. 1593.

(2) Tschachotin, Ueber Strahlenwirkung auf Zellen und die Frage der chemischen Imitation dersellen. *Münch. med. Woch.*, 1912, **44**.

(3) V. Henri. *C. R. Soc. Biol.*, **72-73**, 1912.

(4) Werner, Experim. Untersuch. über die Wirkung von Radiumstrahlen und d. Rolle des Lezithins bei derselben. *Zentral. f. Chir.*, 1907, **73**. — Ueber die chem. Imitation der Strahlenwirkung und Chemotherapie des Krebses. *Medizin. Klinik*, 1912 **28**.

imiter, comme il dit, chimiquement l'action des rayonnements, en injectant à des animaux, ayant des tumeurs malignes, des préparations de la choline et en observant un ramollissement et une destruction de ces tumeurs : c'étaient précisément les cellules cancéreuses qui se cytolysaient électivement.

Mes recherches faites dans cet ordre d'idées, surtout sur d'autres cellules, riches en lécithine, et notamment les œufs d'oursins (1), me permirent tout d'abord d'admettre cette hypothèse; je me servais dans ce but d'un moyen microchimique : la coloration vitale des œufs par le rouge neutre. On sait qu'en présence des ions OH, c'est-à-dire dans un milieu alcalin, cette substance vire au jaune orange. Or les œufs d'oursins, colorés en rouge vif, après être irradiés, accusaient, au bout d'un certain temps, ce virage; on observait le même virage en les traitant, sans irradiation, par une solution de choline. Cette solution, on le sait, est une base assez forte et se dissocie facilement, en mettant les ions OH en liberté.

Les recherches ultérieures me démontrèrent que, dans le bref espace de temps qui est suffisant pour la cytolyse des œufs par les rayons ultra-violets, la formation de la choline par désagrégation photochimique des lécithides ne pouvait pas avoir lieu, mais qu'il s'agissait surtout de l'action des rayons ultra-violets sur la couche superficielle du cytoplasme, dite aussi membrane plasmatique, laquelle, sous l'action de ces rayons, devenait plus perméable aux ions alcalins du milieu, qui, en pénétrant, y provoquaient le virage du rouge neutre. L'expérience, faite dans ce but et qui consistait à placer les œufs dans une solution en l'absence des ions OH, c'est-à-dire dans un mélange de $100 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{NaCl} + 2 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{KCl} + 2 \text{ c. c. } \frac{5m}{8} \text{CaCl}^2$, a montré qu'en irradiant les cellules, colorées en rouge par le rouge neutre, on n'obtenait au début aucun virage. Mais dans un délai de dix à douze heures les cellules étaient devenues jaunes. La décoloration n'était guère due à une diffusion du colorant en dehors par la membrane, devenue perméable à cause de l'irradiation, puisque, en ajoutant quelques gouttes d'acide butyrique $\frac{m}{10}$, on observait le retour immédiat du rouge dans la cel-

(1) Strongylocentrotus lividus.

lule. Ainsi il était prouvé que les ions OH pouvaient provenir des substances à l'intérieur de la cellule.

En me basant sur ces faits, je me suis posé la question de savoir, si dans la cytolyse en général, provoquée par divers agents, on avait également la libération à l'intérieur de la cellule des ions OH. Dans ce but, je fis cytolyser des œufs colorés au rouge neutre dans un milieu sans ions OH et dans un autre, les contenant, en les traitant une fois par une solution fortement hypertonique, et une autre fois par une solution hypotonique, ajoutant en ce dernier cas simplement une grande quantité d'eau distillée. Les expériences montrèrent que, dans le premier cas, se produisait dans la cellule une réaction alcaline, c'est-à-dire qu'il y avait bien la formation d'une base; dans le deuxième cas, il n'y en avait point.

Tous ces faits me conduisent à admettre l'hypothèse suivante de l'action des rayons ultra-violets sur l'œuf : les rayons agissent en premier lieu sur la couche superficielle, coagulant ses colloïdes et en tout cas en la rendant plus perméable; mes expériences récentes sur l'augmentation de la perméabilité de l'œuf, sous l'action des rayons ultra-violets (1), le prouvent suffisamment; comme résultat de la perméabilité accrue et de la pénétration de certains ions du milieu, il s'ensuivrait une décomposition partielle des lécithides et la formation, à l'intérieur de la cellule, de choline ou d'une autre base analogue; la choline décomposerait ensuite les particules des lécithides adjacentes, ce qui augmenterait encore la quantité de choline et ainsi de suite, jusqu'à la complète cytolyse de l'œuf : on aurait dans ce cas une sorte d'autolyse. Le virage du rouge neutre au jaune, à l'intérieur de la cellule irradiée, serait ainsi dû à cette choline, dérivant de l'autolyse des composés lécithiques de l'œuf.

La cytolyse par les rayons ultra-violets se manifeste assez vite par la séparation du corps de la cellule d'une masse hyaline homogène très réfringente. Or, le cytoplasme de l'œuf d'oursin étant constitué par une émulsion des colloïdes protéiques et lipoïdes, vraisemblablement en grande partie lécithiques, on pourrait penser que les premiers forment une couche très mince, enveloppant les particules des seconds, et les stabili-

(1) Tchahotine, Les changements de la perméabilité de l'œuf d'oursin localisés expérimentalement. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, p. 764.

sant. Dans ce cas, il est probable que l'action des ions qui pénètrent dans la cellule, et y produisent la décomposition des lécithides, se manifeste surtout par la coagulation ou la précipitation de cette phase protéique du cytoplasme; les gouttelettes de la phase lécithique, devenant alors libres, se confondent et se fusionnent en formant la masse hyaline. Pendant l'action des rayons ultra-violets, on observe un gonflement de la cellule, qui précède et accompagne la cytolyse et qui devrait être dû à l'imbibition des colloïdes à l'intérieur de la cellule sous l'influence des ions OH, formés par la décomposition des lécithides : on sait que ces ions font gonfler les colloïdes.

CONCLUSIONS

L'action des rayons ultra-violets sur l'œuf d'oursin serait la suivante :

1° Les rayons affectent, en premier lieu, la couche plasmatique, en coagulant ses colloïdes et en augmentant ainsi sa perméabilité;

2° Les ions du milieu ambiant, en pénétrant, grâce à cet accroissement de la perméabilité, précipitent les colloïdes protéiques du cytoplasme, qui entourent les gouttes colloïdales lécithiques;

3° Celles-ci, devenant libres, se confondent, en formant la masse hyaline;

4° Cette masse hyaline est décomposée et donne origine à une base (choline?);

5° Laquelle augmente cette décomposition et dont les ions OH provoquent un gonflement par imbibition des colloïdes protéiques du cytoplasme, jusqu'à la complète désagrégation de la cellule.

(Travail fait au Musée océanographique de Monaco
et au Laboratoire russe de zoologie à Villefranche-sur-Mer.)

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES AVEC UN SPIROCHÈTE, SE TROUVANT SPONTANÉMENT CHEZ LE LAPIN ET RESSEMBLANT AU *TREPONEMA PALLIDUM*

(COMMUNICATION PRÉLIMINAIRE)

par le Dr A. KLARENBEEK.

Cinq lapins hollandais adultes (dont un bouquin) apparemment en bonne santé, appartenant tous au même propriétaire, furent achetés en octobre 1920, parce qu'ils étaient porteurs de lésions de la région périnéale (fig. 2). La région de l'anus et de la vulve, de l'anus et du prépuce était fort enflammée. Le tout proéminait plus ou moins sur les tissus environnants, de sorte que les ouvertures naturelles étaient à peine visibles à cause de l'enflure. Les croûtes sèches, qui couvraient le centre de l'endroit enflammé, tenaient en général ferme à la peau, elles étaient d'une nuance rouge-brun foncé ; celles qui se trouvaient à la périphérie avaient un aspect écailleux, elles étaient très petites et peu adhérentes. Les poils étaient tombés à l'endroit de la lésion, à la périphérie ils tenaient encore en partie. La peau d'alentour, non recouverte de petites écailles blanches, était rouge et enflée, œdémateuse. Sous les croûtes adhérentes enlevées existait une surface rouge, légèrement saignante. En saisissant les tissus entre le pouce et l'index, de sorte qu'on pressait sur toute la région périnéale saillante, les croûtes quelquefois se détachaient soudainement en partie et parfois le tissu lui-même se déchirait et laissait une surface couverte de fentes.

En raclant la surface et en éloignant les croûtes on obtenait un liquide qui contenait dans tous les cas de nombreux spirochètes dont le mouvement pouvait être constaté dans le champ obscur à la température de la chambre. Les spirochètes avaient

un mouvement vif comme celui d'une anguille et étaient faiblement réfringents. Ils étaient aussi animés de mouvements tournants comme celui d'une corde balancée dans le jeu d'enfants appelé « saut à la corde ». Quand le parasite se heurtait contre un objet quelconque, le mouvement devenait



Fig. 1. — Coloration de l'argent de Fontana (1.050). Raclage superficiel de la cornée. Six semaine après l'inoculation intra-oculaire.

très vif et ressemblait beaucoup au tortillement d'un serpent sur lequel on a marché.

Pour colorer les lamelles, on se servait le plus souvent de la coloration à l'argent de Fontana (fig. 1). Bien que par ce procédé les spirochètes perdissent de leur aspect naturel, ce moyen valait mieux que la méthode « Tuche de Burri », qui rendait beaucoup de spirochètes indistincts ou que la méthode de Giemsa, qui ne les colore que très faiblement. Plus tard j'employai la modification suivante de la technique de Fontana : au lieu de laisser pendant longtemps la préparation dans la solution de tanin phéniqué, je versais le liquide sur la lame et je tenais

celle-ci pendant environ vingt secondes au-dessus d'une flamme (jusqu'à l'ébullition), après quoi l'imprégnation avec l'argent se manifestait aussi fortement qu'avec la méthode originale.

En se servant de la méthode de Levaditi on pouvait colorer les spirochètes dans les tissus de la région périnéale Ces spirochètes sont, sous tous les rapports, absolument semblables au *Treponema pallidum* et ne se distinguent pas de celui-ci.

J'ai fait des expériences d'inoculation pour en comparer les résultats avec ceux de Uhlenhuth et Mulzer; les résultats préliminaires de ces expériences peuvent être communiqués ici :

1° La scarification de la région périnéale avec une émulsion de matériel contenant des spirochètes (pièce de tissu sous la croûte) donnait dans tous les cas des résultats positifs.

L'incubation la plus courte était de onze jours, le plus souvent pourtant les spirochètes se montraient après trois ou quatre semaines. Il ne se formait pas d'ulcération à bords indurés. Les endroits enflammés se montraient en général comme des excoriations sans autre signe d'inflammation qu'un peu de rougeur sans enflure. Les excoriations étaient le plus souvent humides, situées surtout dans les plis à côté de la vulve, elles se couvraient de pseudo-membranes d'une nuance jaune. Lorsque la vulve (muqueuse ou peau) était le siège du mal, on constatait de la rougeur et une enflure assez forte. Dans les cas invétérés l'aspect était semblable à celui des lésions des lapins à maladie spontanée. Dans un seul cas une guérison se produisit après quelques semaines.

2° L'inoculation par scarification de la peau dorsale avec le même matériel que celui employé dans les expériences précédentes était suivie dans quatre cas sur six d'un résultat positif. L'incubation la plus courte fut d'un mois, la plus longue de deux mois. Dans tous les cas positifs les lésions furent superficielles (ayant tout au plus la grandeur d'une pièce de 50 centimes), pas trop profondes, peu saillantes, couvertes de petites croûtes blanches quelquefois foncées, le plus souvent détachées et contenant beaucoup de spirochètes.

3° L'INJECTION SOUS-CUTANÉE DANS LA PAUPIÈRE SUPÉRIEURE du même virus que celui de la première expérience produisit des ulcères sur la paupière supérieure après une incubation de cinq à huit semaines. Les ulcères étaient plus ou moins en relief, avaient la grandeur d'un grain de plomb, ils se couvraient d'abord d'écailles blanches, plus tard de croûtes plus foncées. Sous les croûtes existait une surface humide d'un rouge clair, dans laquelle on trouvait beaucoup de spirochètes.

4° L'INOCULATION INTRA-OCULAIRE a fourni également quelques résultats positifs. Dans une expérience avec le matériel mis en

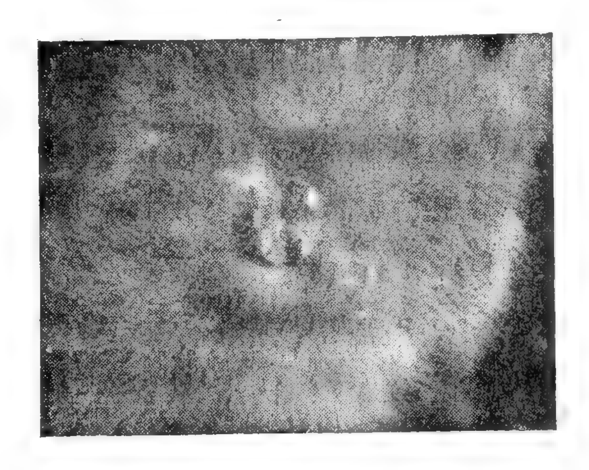


FIG. 2. — La région périnéale d'une lapine atteinte de la spirochétose spontanée.

œuvre dans les cas rapportés au paragraphe 1, 0,5 c.c. de l'émulsion fut injectée dans la chambre antérieure des deux yeux.

L'un des deux yeux, après trois mois, ne montrait aucune réaction. A l'autre œil, qui lui-même restait en apparence absolument normal, apparaissaient après deux mois des ulcères sur la paupière supérieure dans lesquels il y avait des spirochètes. Après l'introduction dans la chambre antérieure de quelques lapins de petits fragments de tissu périnéal provenant d'un des lapins achetés, on pouvait constater au bout d'une incubation de quarante et un à quarante-trois jours une kératite avec spirochètes dans le produit du raclage superficiel de la cornée.

Dans quelques cas on ne trouva pas de spirochètes dans le raclage superficiel de la cornée après inoculation dans la chambre antérieure de l'œil ou après introduction dans celle-ci de

fragments de tissu, mais il survenait après huit semaines des ulcères sur la paupière supérieure, semblables à ceux décrits plus haut. Dans un seul cas les ulcères palpébraux furent accompagnés d'une hyperplasie de la conjonctive sclérale, dans laquelle existaient des spirochètes qui furent employés pour des inoculations.

5° L'inoculation intratesticulaire donna dans trois cas après huit semaines des érosions sur le scrotum ayant l'aspect de celles décrites sur le dos (voir paragraphe 2); elles contenaient des spirochètes. Il faut encore signaler l'apparition dans le scrotum d'une tumeur de la grosseur d'un petit pois qui n'adhérait ni à la peau, ni au testicule; la macération de ce nodule montrait des spirochètes innombrables.

6° Injections intraveineuses. Une émulsion filtrée, contenant des spirochètes, injectée dans la veine ne fut suivie jusqu'ici d'aucun résultat positif.

Quelques animaux moururent d'autres infections après l'injection intraveineuse; chez d'autres l'incubation est encore trop récente pour pouvoir en tirer des conséquences.

7° Une infection générale fut constatée (dix semaines après l'inoculation intra-oculaire [Sp. + après six semaines] et après deux semaines, à la suite de l'inoculation intratesticulaire); elle se traduisit par des ulcérations sur la peau du dos, à la base de l'oreille, à la région du nez et de l'œil. Le lapin restait en bonne santé.

8° Une infection spontanée a pu être constatée chez une lapine qui avait vécu deux mois avec les animaux achetés.

Arzt et Kerl ont déjà constaté en 1914 la présence de cette maladie des parties génitales et ont mentionné l'identité du spirochète avec le *Treponema pallidum*.

Dans le *Wiener klin. Wochenschr.*, 1914, n° 29, ils ont publié le résultat de leurs recherches ultérieures sur 800 lapins, sur lesquels ils ne trouvèrent pas moins de 26,9 p. 100 d'infectés. Ils transmirent la maladie seulement par scarification de la région périnéale. Plus tard Arzt constatait ensuite la maladie chez des lapins d'Innsbrück (*Dermatol. Zeitschr.*, t. XXIX, f. 2, 1920).

Sans connaître cette littérature Jacobsthal décrivit (*Dermatol. Wochenschr. Leipzig*, t. 71, n° 33) en 1920 une maladie pareille et ne put provoquer une spirochétose locale que par scarification de la région de la vulve. Et enfin les plus récentes publications de Arzt et Kerl dans le *Dermatol. Wochenschr.*, n° 52, 1920, et de Schereschewky dans le *Berl. klin. Wochenschr.*, n° 48, 1920, ne donnent guère de renseignements éclaircissant le problème de l'identité de ce spirochète et du *Treponema pallidum*.

En comparant les résultats de ces recherches avec ceux obtenus avec le *Treponema pallidum*, il faut conclure que *le spirochète trouvé sur ces lapins est absolument identique avec le Treponoma pallidum ou en tout cas qu'il en est très rapproché.*

La preuve absolue qu'on a ici affaire à une syphilis spontanée du lapin ne sera jamais donnée par des expériences, pas même si elles étaient positives sur les singes (ces expériences sont déjà commencées), puisqu'il manquerait le dernier chaînon de la recherche, l'infection de l'homme.

D'après ces expériences, *les recherches expérimentales sur la syphilis poursuivies sur le lapin deviennent douteuses* parce qu'on ne peut plus se fier à elles, tant que l'identité du spirochète n'est pas établie. Et encore après avoir constaté son identité, il restera très douteux que l'on puisse se servir du lapin comme animal d'épreuve pour la syphilis. On ne pourrait le faire qu'après avoir soumis les animaux pendant deux ou trois mois à une observation soigneuse avant de les utiliser pour des expériences.

D'ailleurs on risque d'inoculer avec le virus syphilitique un animal soi-disant sain, mais *souffrant de spirochétose spontanée et latente* qui se traduira plus tard par des ulcères non syphilitiques sur lesquels on croira prélever un virus syphilitique. Il peut encore arriver que l'on tire de fausses conséquences concernant l'incubation, etc., quand ce spirochète se manifestant spontanément paraît être plus tard un *Treponema pallidum*.

(Travail de l'Institut des maladies parasitaires et infectieuses, professeur : Dr L. de Blieck,
et de la Clinique des petits animaux domestiques, professeur : Dr H. Jakob, de l'Académie vétérinaire d'Utrecht.)

L'AGALAXIE CONTAGIEUSE
DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE (*suite*)

par H. CARRÉ.

Mes recherches sur l'agalaxie ayant été interrompues de la façon la plus radicale en 1914 et ne conservant guère l'espoir d'avoir jamais la possibilité de les reprendre et de les continuer, je donne, dans ce court exposé, ce qu'il m'a été possible de constater, depuis la publication de mon premier mémoire (*Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1912) jusqu'en 1914.

Persistance du virus dans la mamelle.

Bien que j'aie déjà attiré l'attention sur ce point particulier, en contradiction avec les affirmations de certains auteurs, je crois utile d'y insister à nouveau, car cette persistance de la virulence du liquide mammaire a une grande importance étiologique.

En effet, cette pérennité n'est pas un fait exceptionnel, le nombre d'animaux sur lequel j'ai opéré, au laboratoire, est forcément limité, mais la constance des résultats obtenus ne laisse aucun doute sur le danger réel que présentent ces porte-virus. D'autant plus que beaucoup de ces animaux, au bout de quelques mois, reprennent un embonpoint assez satisfaisant et que rien, dans leur aspect extérieur, n'attire l'attention sur eux.

Le 9 octobre 1912, j'injecte dans la mamelle de quatre chèvres quelques gouttes de virus agalaxique. Une d'elles meurt le 29 octobre d'agalaxie aiguë ; une autre meurt cachectique le 3 mars 1913.

Les deux autres, après un amaigrissement et des boiteries de longue durée, se remettent complètement : elles sont gaies, vives, avec un poil bien luisant : leur mamelle ne sécrète plus, fin mars 1913, que quelques gouttes de sérosité louche.

Le 27 mars, une chèvre 702 reçoit dans le trayon droit 1/1.000 de cent. cube de cette sérosité : le 6 avril, le quartier inoculé est volumineux, chaud, tendu, et fournit à la mulsion un liquide séreux louche avec grumeaux caractéristiques.

Le 31 mars, une chèvre 704 reçoit dans le trayon droit 20 cent. cubes de filtrat, sur bougie Chamberland L1, de la même sérosité : le 7 avril, le quartier inoculé fournit un liquide louche avec tortillons puriformes.

Ainsi, plus de six mois après le début de l'infection, le liquide mammaire s'est encore montré virulent.

Dissémination du virus.

J'ai déjà fait voir comment, bien que le virus agalaxique cultive dans des organes clos (articulations, œil, mamelle), il pouvait être répandu à l'extérieur par les larmes s'écoulant de l'œil malade, même sans perforation de cet organe.

Il m'a été permis de constater un autre mode de dissémination. Si l'on abandonne une mamelle infectée sans la vider de son contenu, le sinus se remplit du liquide spécial qui a remplacé le lait normal, l'organe est parfois fortement distendu.

Par le fait de cette distension continue, le sphincter du trayon semble perdre sa vigueur constrictive : la moindre pression de la main fait sourdre très facilement une certaine quantité de liquide.

L'effort de la main n'est même pas nécessaire : le liquide s'écoule également quand, l'animal étant couché, la cuisse supérieure vient faire pression sur la mamelle lésée.

Il y a là encore une cause très nette de dissémination du virus, aussi serait-il à recommander de traire à fond la mamelle infectée, de prendre les précautions nécessaires pour empêcher, pendant la traite, le liquide d'être projeté hors du vase destiné à le recueillir et de le stériliser par l'ébullition. Mais il est certainement plus économique d'éliminer radicalement du troupeau ces dangereux malades.

La vaccination n'empêche pas l'infection directe de la mamelle.

Nocard a montré (*Société de Biologie*, 18 juillet 1891) que la bactéridie charbonneuse, injectée dans le sinus mammaire

d'une chèvre vaccinée contre le charbon, cultive indéfiniment et que le lait de chaque traite est virulent.

L'animal, protégé par la vaccination, résiste à l'infection générale, mais la bactéridie cultive dans la mamelle comme elle le ferait *in vitro*.

Ce fait, très remarquable au point de vue général, n'a aucune importance dans l'étiologie du charbon. J'ai voulu m'assurer s'il en était de même pour l'agalaxie. Ce point particulier avait en effet un certain intérêt. Il est des pays, en Italie notamment, où l'agalaxie sévit sur les brebis destinées à la production du lait et il est établi que l'infection de la mamelle, si facilement réalisable par l'inoculation expérimentale du virus par les divers modes d'inoculation, peut être provoquée directement par les mains des personnes chargées de la traite, passant sans précautions d'une mamelle infectée à une mamelle saine.

Le lait de ces brebis sert à la préparation de fromages : et il faut croire que la proportion de liquide altéré, qui n'a plus rien de commun avec le lait, est parfois assez grande puisque la pâte des fromages en est nettement modifiée.

Il fallait donc s'assurer que la vaccination, capable d'empêcher l'infection générale et les localisations oculaires et articulaires, à la suite de l'absorption du virus par les voies digestives, pouvait également enrayer l'infection directe de la mamelle.

Le 8 mars 1913, deux chèvres, 702 et 703, reçoivent, sous la peau, un mélange de 1/10 de cent. cube de virus et de 5 cent. cubes de sérum antiagalaxique.

Le 27 mars, chacune d'elles reçoit, ainsi qu'une chèvre 705, témoin, 1/1.000 de cent. cube de virus dans le trayon droit. Le 2 avril, ces trois chèvres, vaccinées et témoins, présentent de la crépitation caractéristique du trayon inoculé et fournissent du lait altéré.

La vaccination simple (séro-vaccination) est donc insuffisante pour empêcher l'infection de la mamelle par l'introduction directe du virus dans cet organe. C'est vraisemblablement cette particularité qui permet d'expliquer l'échec total d'une grosse expérience de vaccination réalisée sous la direction de M. Bisanti, inspecteur de la Santé publique à Rome, sur plusieurs centaines de brebis en pleine lactation de la campagne romaine. La séro-vaccination (5 cent. cubes de sérum mélangée à 1/5 de cent. cube de virus) se montre inoffensive, mais n'empêche nullement l'apparition de l'agalaxie.

Ces brebis fournissaient du lait et la traite en était effectuée sans aucune précaution contre l'infection par la main des trayons.

Nous avons cherché à procurer une immunité plus solide en inoculant d'abord le séro-vaccin, puis une forte dose de virus seul.

Le 5 avril 1913, on injecte sous la peau d'une chèvre 712 1/10 de cent. cube de virus sensibilisé : une autre chèvre 715 reçoit 1/10 de virus mélangé à 5 cent. cubes de sérum.

Le 25 avril, chacune de ces chèvres reçoit sous la peau 1/2 cent. cube de virus, dose énorme : les deux chèvres supportent parfaitement cette inoculation, elles étaient solidement immunisées.

Le 20 mai, on leur injecte dans le trayon gauche 1/2 cent. cube de virus. Dès le 25 mai les trayons inoculés sont infectés.

L'immunité renforcée paraît donc, elle aussi, incapable de protéger la mamelie contre l'infection directe.

Poussant encore plus avant nos investigations dans cet ordre d'idée nous avons injecté, le 18 mars 1914, toutes nos femelles (7), destinées à la production du sérum antiagalaxique et qui avaient reçu des doses élevées de virus, dans la mamelle en pleine lactation.

Cette fois le résultat fut très net, la mamelle se montra réfractaire ; examiné pendant un mois le lait ne subit aucune modification.

L'immunité de la mamelle semble donc ne pouvoir être obtenue qu'au prix d'une imprégnation prolongée de l'organisme par des doses considérables de virus, telles que peuvent en recevoir les animaux producteurs de sérum.

Une solution pratique ne paraît guère réalisable dans ces conditions, à moins de vacciner spécialement la mamelle par l'injection de sérum virus dans le trayon. C'est une expérience qui mériterait d'être réalisée.

Modification de la virulence.

Nous n'avons pas constaté de changements appréciables dans l'activité du virus agalaxique.

Le même virus, pendant un an, à des intervalles très rapprochés, fut inoculé de mamelle à mamelle chez des chèvres. L'infection de la mamelle fut réalisée chez tous ces animaux

sans aucune exception avec des doses minimes 1/100, 1/200, 1/1.000 de cent. cube; mais les localisations oculaires ou articulaires ne furent ni plus nombreuses ni plus graves, la mortalité ne fut pas plus élevée, l'amaigrissement consécutif ne fut pas plus prononcé dans les derniers lots que dans les premiers.

La période d'incubation ne fut raccourcie en rien.

Vaccination par virus sensibilisé.

La sensibilisation des virus filtrables se heurtait à de grandes difficultés techniques : on connaît la façon très originale par laquelle Bridré et Boquet ont pu obtenir le virus claveleux sensibilisé et les résultats véritablement splendides qu'ils en ont tirés en pratique.

Il était indiqué de rechercher si la méthode pouvait s'appliquer au virus agalaxique.

Le 26 novembre 1913, on mélange 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique, préalablement débarrassé de ses grumeaux par une centrifugation peu prolongée (trois minutes à 1.500 tours), avec 10 cent. cubes de sérum antiagalaxique : on place le mélange pendant un quart d'heure dans l'agitateur de Jousset, puis on l'abandonne à la glacière jusqu'au 29 novembre.

Le 29 novembre, le mélange est centrifugé pendant deux minutes à 3.500 tours : il se forme un culot au fond du tube : le liquide surnageant est rejeté, puis le culot est remis en émulsion dans 20 cent. cubes de solution physiologique.

Un agneau 691 reçoit sous la peau de l'épaule 1 cent. cube de l'émulsion : un agneau 692 en reçoit 2 cent. cubes.

On doit admettre que la totalité des éléments virulents n'a pas été centrifugée et que le culot ne représente, en réalité, qu'une partie du virus, mais la dose reçue par chaque agneau, si le virus n'avait pas été sensibilisé, était de beaucoup suffisante pour l'infection.

L'inoculation ne fut suivie d'aucun symptôme quelconque d'agalaxie.

Le 16 décembre, ces deux agneaux et un témoin agneau 695 reçoivent chacun dans le muscle de la cuisse 1 cent. cube de lait agalaxique.

Le 2 janvier, le témoin présente une kératite intense de l'œil gauche ; il est très amaigri, les traités continuent à se bien porter et ne présentent rien d'anormal dans la suite.

Il semble donc que le virus sensibilisé soit susceptible d'être utilisé avantageusement *chez le mouton*.

Connaissant la grande sensibilité des chèvres au virus agalaxique, nous avons renouvelé l'expérience sur 4 de ces animaux en utilisant des doses plus faibles.

Le 18 décembre 1913, 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique, centrifugés, sont mélangés à 50 cent. cubes de sérum, le mélange est agité pendant un quart d'heure, puis déposé à la glacière jusqu'au 21 décembre.

Le 21 décembre, le mélange est centrifugé à 3.500 tours pendant cinq minutes : le culot est remis en suspension dans 10 cent. cubes de solution physiologique.

Chaque chèvre reçoit sous la peau 1/10 de cent. cube de l'émulsion.

Toutes les quatre présentent dans la suite une mammite agalaxique.

Ainsi une dose de virus sensibilisé environ dix fois moindre que celle qui est bien supportée par un agneau non seulement ne procure pas l'immunité à la chèvre, mais provoque chez elle l'apparition de la maladie typique.

Inoculation à la vache.

Le 31 janvier 1913, une vache reçoit dans le trayon antérieur droit 10 cent. cubes de liquide mammaire agalaxique d'une chèvre infectée depuis le 17 novembre 1912. Le 6 février, le trayon, ni chaud ni sensible, donne aux doigts qui le compriment une crépitation identique à celle que l'on constate sur les chèvres agalaxiques.

Le liquide obtenu par la mulsion est jaune, consistant, grumeleux, avec de la sérosité louche et un peu teintée par du sang. Le 14, le trayon donne des tortillons jaunâtres, sans sérosité. Le centre de la cornée gauche montre une plaque de kératite d'un centimètre de diamètre. Le 18, la kératite n'a pas augmenté : le trayon fournit 150 cent. cubes de matière jaunâtre en tortillons, sans sérosité.

Le 26, la lésion oculaire est en voie de régression. L'animal ayant dû quitter le laboratoire, nous n'avons pu le suivre plus longtemps.

Des expériences de vaccination sur un grand nombre de chèvres avaient été entreprises en Suisse, en 1914, pour l'Office vétérinaire du département fédéral de l'économie publique. Une lettre officielle du 8 mai 1915 m'informait qu'en raison de la mobilisation des vétérinaires qui avaient procédé aux inoculations, aucun renseignement ne pouvait m'être fourni sur les résultats obtenus.

RECHERCHES SUR LE ROLE DE LA GLOBULINE DANS LA RÉACTION DE WASSERMANN,

AVEC UNE CONTRIBUTION A LA TECHNIQUE DE LA DIALYSE ET A L'EXÉCUTION DU WASSERMANN (1)

par G. KAPSENBERG, de Leyde, à présent Groningue (Pays-Bas).

Ce mémoire se compose de trois parties qui, bien que dépendantes l'une de l'autre, constituent cependant chacune un tout distinct.

A. — SUR UNE TECHNIQUE SPÉCIALE DE DIALYSE

Pour les expériences, dont le compte rendu des résultats sera mentionné dans la troisième partie de ce mémoire, j'ai dû faire un usage détaillé de la dialyse.

Il m'a paru d'emblée nécessaire de me servir d'une technique de dialyse, offrant les avantages suivants : *sûreté* (les colloïdes étant retenus avec certitude, tandis que les cristalloïdes passent); *vitesse* (les cristalloïdes traversent la membrane le plus rapidement possible); *précision* (les quantités étant déterminées elle doit permettre d'obtenir sans erreur appréciable la totalité des substances, même lorsqu'on opère avec de petites quantités).

Je crois que j'ai réussi à satisfaire à ces exigences et comme le processus de la dialyse a ses explications sur tout le terrain de la science physique et biologique, il me semble utile de donner ici une courte description de la technique dont je me suis servi.

On se sert pour la dialyse de membranes d'origine animale et végétale.

Parmi les membranes d'origine animale, je rappelle la vessie

(1) Les expériences ont été exécutées dans le laboratoire de la policlinique de dermatologie et vénérologie de l'Université de Leyde (Directeur, Dr J. H. P. van Kerckhoff, chargé de cours à l'Université).

du porc et celle nommée du poisson. La première était trop épaisse pour le but que je poursuivais; la deuxième est d'une manipulation incommode.

Parmi les membranes d'origine végétale, on se sert le plus souvent du papier parchemin, qui a pourtant le défaut de dialyser assez lentement et de se laisser ajuster difficilement autour d'un dialyseur cylindrique. Les capsules de parchemin de Schleicher et Schüll, telles qu'elles sont employées dans la réaction d'Abderhalden, ont à l'intérieur une surface trop rugueuse pour permettre de travailler quantitativement.

Metchnikoff (1), à l'instigation de Kroutizine, a employé une membrane qui se trouve dans la cavité intérieure des segments de roseaux (*Phragmitis communis*). Cette membrane a été examinée par Podbelsky (2) et surtout par Philippson (3) et elle s'est montrée très favorable pour la dialyse. Seulement la technique n'est pas facile et cette membrane n'est pas utilisable à tous les cas. Les membranes de collodion, si bonnes qu'elles puissent être, sont d'une fabrication incommode et longue.

Or van Calcar (4) a attiré l'attention sur l'amnios de l'homme et des animaux, comme membrane très apte à la dialyse. Et, en effet, cette membrane mince, plissable, élastique, apparaît immédiatement comme idéale. Seulement elle se montrait impropre pour mes expériences, parce qu'elle laissait passer les substances albuminoïdes. Cette particularité est bien connue de van Calcar, et il l'interprète d'une façon très ingénieuse, mais qui me paraît pourtant inexacte.

Suivant van Calcar, la globuline passe à cause de la réaction alcaline du sérum et l'albumine à cause des sels. En effet, aussitôt que la grande majorité des substances alcalines et des sels est extraite par la dialyse, la membrane ne laisse plus passer ni la globuline, ni l'albumine. Si séduisante que soit cette explication, je crois qu'elle n'est pas d'accord avec les faits. Pour ma part, j'attribue cette particularité des mem-

(1) Ces *Annales*, t. **1**, 1887, p. 326.
(2) Ces *Annales*, t. **12**, 1898, p. 431.
(3) *Beiträge* (de Hofmeister) *zur chem. Phys. und. Path.*, 1902, p. 80.
(4) *Dialyse, Eiweisschemie und Immunität.* Leyde. S. C. van Doesburgh; Leipzig, Joh. Ambr. Barth., 1908.

branes tout simplement à leur porosité : les pores étant trop grands pour retenir la globuline et l'albumine.

Comment expliquer alors le fait que les substances albuminoïdes cessent bientôt de passer?

La réponse est la suivante :

Par suite de l'extraction des sels, la globuline du sérum se précipite sur et dans la membrane et obstrue les pores. Conformément à cette interprétation, le passage de la globuline et de l'albumine me semble dépendre d'un défaut de la membrane et non pas de la réaction alcaline et des sels du sérum.

Pour prouver la justesse de cette explication, et surtout pour tâcher d'enlever aux membranes amniotiques leur perméabilité pour les albuminoïdes, j'ai recherché si les processus qui conduisent à un rétrécissement du tissu conjonctif ne pourraient pas amener une obturation des pores. Pourtant, les méthodes usuelles de fixation n'aboutirent pas au but poursuivi : l'alcool, la formaline, l'acide chromique laissaient la membrane perméable. Enfin, je suis parvenu au but visé par un procédé très facile, à savoir en chauffant les membranes dans de l'eau. Quand celle-ci a atteint une température de 70-80° on observe que la membrane, tout en exprimant un grand nombre de fines bulles d'air, se contracte très remarquablement.

La consistance est pourtant restée bonne, et il a été constaté que les substances albuminoïdes étaient alors retenues entièrement, sans que la perméabilité pour les sels eût notablement diminué. J'ai observé ensuite que les membranes résistaient très bien à une température de 100° pendant une minute (même davantage).

La technique précise dont je me sers pour préparer les membranes amniotiques est la suivante :

Aussitôt que possible, après que le placenta avec les membranes est arrivé au laboratoire, je sépare prudemment (avec les mains) l'amnios du chorion et du placenta. Le plus souvent cette opération ne présente aucune difficulté ; parfois on observe que l'amnios est déjà séparé du chorion par la nature ; il est très rare que l'on ne réussisse pas la séparation. Ensuite, on lave à l'eau courante pendant un à deux jours. Les membranes deviennent alors blanc bleuâtre ou gardent une teinte verdâtre.

Elles ont un côté lisse, celui de l'épithélium (1), et un côté plus ou moins gélatineux, celui qui a été en contact avec le chorion. On étale la membrane sur un verre plat (de préférence noirci), l'épithélium étant dirigé vers le bas. On peut alors enlever, en se servant du pouce, et sans difficulté, par des mouvements doux, mais un peu énergiques, la grande majorité de la masse gélatineuse un peu cohérente. La membrane est encore lavée pendant quelque temps et chauffée dans une quantité suffisante d'eau ordinaire. On a soin, au moyen par exemple de la partie close d'une éprouvette, de bien déployer la membrane avant et pendant que le rétrécissement s'établit. On attend que l'eau bouille distinctement, on la laisse bouillir pendant une minute, puis on retire la membrane de l'eau. On peut employer la membrane immédiatement ou la conserver.

La conservation peut se faire par deux procédés aussi efficaces; l'un consiste à plonger les membranes préparées dans la glycérine concentrée ou dans un liquide contenant au moins 60 cent. cubes de glycérine et 40 cent. cubes d'eau distillée. Dans l'autre procédé on suspend les membranes cuites, bien étalées devant une fenêtre, pour qu'elles sèchent rapidement au courant d'air. Elles sont ensuite gardées à sec dans un flacon bouché à l'émeri. Avant d'utiliser ces membranes on les fait tremper dans l'eau pour enlever la glycérine et dans le second cas pour leur rendre leur souplesse.

Elles ont une consistance satisfaisante ; elles sont assez résistantes, élastiques, un peu comme le caoutchouc et se laissent très facilement appliquer autour d'un vase cylindrique pour en faire un dialyseur.

Pour opérer avec ces membranes, j'ai fait fabriquer des dialyseurs du modèle ci-contre (fig. 1). Ils ont trois petits crochets en verre, par lesquels on peut les suspendre au moyen de chaînettes (2) à un support approprié, portant aussi trois crochets. Les membranes étant très minces, il faut se

(1) Van Calcar pense que c'est l'épithélium de l'amnios qui devient gélatineux, ce qui n'est pas exact. Il suffit, pour s'en convaincre, de marquer par un petit nœud (comme pour la ligature d'un artère) le côté de la membrane qui a été en contact avec le liquide amniotique. Ce dernier reste lisse, tandis que l'autre est recouvert d'une couche plus ou moins gélatineuse.

(2) Les chaînettes sont indispensables pour permettre de placer commodément les dialyseurs dans un plan parfaitement horizontal, le verrier ne pouvant pas appliquer les crochets précisément dans le même plan.

garder de heurter le côté de la membrane (*b*) contre un objet dur (par exemple un autre dialyseur). Pour empêcher autant que possible un accident de ce genre, j'ai choisi la forme un peu ventrue. Un bon modèle, mais un peu compliqué, est celui avec six pointes protectrices, placées immédiatement au-dessus de la membrane (voir A). Les dialyseurs sont de différente grandeur, l'orifice inférieur a un diamètre d'environ 6 cm., 4 cm. ou 2 cm. 5. Le plus souvent je me suis servi des dialyseurs de 2 cm. 5 et de 4 centimètres. On ajuste la membrane, *le côté de l'épithélium tourné vers l'intérieur du dialyseur*; sa

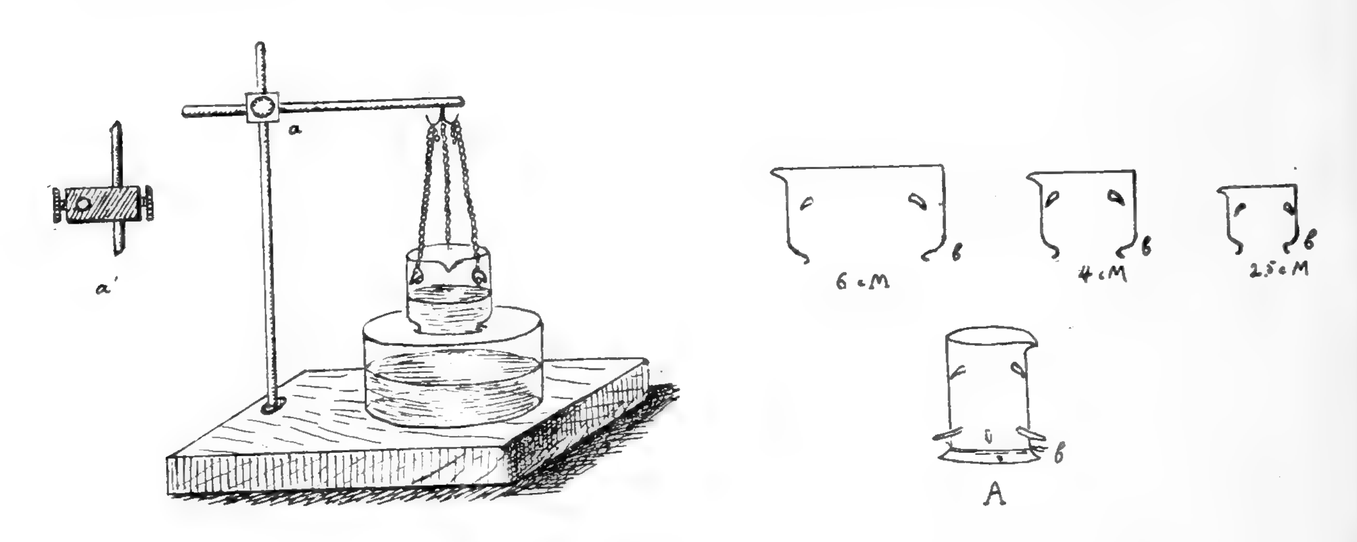


Fig. 1. — Appareils pour faire la dialyse avec les membranes amniotiques.

A gauche : support. La pièce métallique *a* (*a'* = *a* vue d'en haut) est trouée deux fois et munie de deux vis. Elle permet de donner aux dialyseurs les situations qu'ils doivent avoir. On peut ranger plusieurs supports à côté l'un de l'autre et plonger les dialyseurs dans un vase oblong, formant ainsi une véritable batterie de dialyseurs. Quelquefois il est commode de faire tourner le dialyseur d'un angle de 180° autour de *a*.

A droite : différents modèles de dialyseurs.

surface lisse permet d'opérer quantitativement. La fixation se pratique le mieux avec de la soie.

Avant de se servir de la membrane, il faut contrôler si elle est parfaitement étanche. Pour cela, on remplit le dialyseur d'eau et on le suspend en l'air On sèche ensuite la membrane avec un morceau de papier filtre. Quand elle reste sèche pendant une heure, ou quand elle ne laisse transsuder après ce temps qu'une trace d'eau, on peut s'y fier entièrement.

On peut stériliser le dialyseur muni de sa membrane en le suspendant dans l'intérieur d'un autoclave et en chauffant pendant quinze minutes à la pression d'une demi-atmosphère, ou encore pendant une demi-heure dans la vapeur sans pression. La

membrane ainsi traitée garde sa propriété, elle est seulement un peu moins résistante.

Pour finir, quelques mots sur les qualités des membranes. L'épaisseur des membranes séchées est de 0 mm. 02 à 0 mm. 03, rarement 0 mm. 04 (1). On trouve la dernière dimension surtout à la partie, d'ailleurs bien utilisable, qui recouvre le placenta. L'endroit de l'amnios, qui a recouvert une artère, mesure quelquefois 0 mm. 05. Je rappelle que la membrane du *Phragmitis communis* a une épaisseur de 0 mm. 08 (Philippson) et que le papier parchemin le plus fin (ordinairement inutilisable) a une épaisseur de 0 mm. 04 à 0 mm. 05.

Les membranes se sont montrées imperméables pour les albuminoïdes du sérum (homme, bœuf), du liquide ascitique, de l'œuf de poule, du lait. Quelquefois avec le lait la membrane semble laisser passer après vingt-quatre heures une trace douteuse de substance albuminoïde; la membrane ayant été traversée, déjà en une heure, par des quantités notables de sels et de sucre, l'eau ambiante forme bientôt un bon milieu de culture, de sorte qu'elle est troublée à la température de la chambre par une flore bactérienne appréciable. Il est donc possible que cette albumine provienne des microbes. Or, en ajoutant quelques cristaux de thymol à l'eau distillée, je n'ai plus décelé le passage d'aucune substance albuminoïde.

En partie avec l'aide du professeur de Graaff, qui m'assistait pour les réactions chimiques et du Dr Montagne, qui me fournissait les substances nécessaires (services pour lesquels je leur exprime ici ma profonde gratitude), j'ai recherché la perméabilité pour divers cristalloïdes. Dans le dialyseur on place 5 c. c. d'une solution à 1 p. 100 (ou saturée si la substance ne se dissout pas suffisamment) et on l'entoure de 25 cent. cubes d'eau distillée. Après trois à quatre heures, on peut très distinctement montrer la présence des sels. Les substances suivantes ont été examinées :

$NaCl$, KI, KBr, $KAzO^3$, $(AzH^4)^2SO^4$, $MgSO^4$, K^2HPO^4, K^2CO^3; des amino-acides comme le glycocolle, l'alanine, l'acide asparagine ; peptone ; glucose. Les membranes résistent très bien à l'action caustique d'une solution de $CuSO^4$ à 10 p. 100. On peut

(1) L'épaisseur a été mesurée au moyen d'une vis micrométrique, les membranes sèches étant découpées le long des bords du dialyseur.

se faire une idée de la vitesse de la dialyse par le fait que dix minutes après avoir mis la solution physiologique dans le dialyseur, on peut montrer le sel marin dans l'eau distillée.

Je puis donc recommander la technique ci-dessus à tous ceux qui ont besoin de se servir de la dialyse.

Il reste à déterminer si la membrane se prête aussi à la réaction d'Abderhalden. Jusqu'ici j'ai seulement établi qu'une membrane, après un séjour de quinze jours dans l'eau distillée (entourée de glace), n'a laissé passer dans l'eau aucune substance albuminoïde ou donnant une réaction positive avec la ninhydrine.

APPENDICE

L'*amnios* humain ne fournissant que des membranes de dimensions médiocres, on peut, pour dialyser de grandes masses, se servir avantageusement de l'amnios et surtout de l'allantoïde de la vache. On obtient alors des membranes d'une étendue très notable. Ces membranes se laissent isoler de la même façon que l'amnios humain. Elles me semblent un peu plus résistantes. La préparation en est cependant un peu plus incommode. La masse gélatineuse, volumineuse se laisse écarter avec plus de difficulté. Il est préférable de laisser les membranes plus de deux jours dans l'eau courante. Il faut cependant remarquer qu'on doit éviter la putréfaction, qui rend les membranes inutilisables. Comme l'amnios humain, elles laissent, à l'état cru, passer les albuminoïdes. Quand on les cuit, elles présentent les mêmes qualités que celles que j'ai décrites à propos des membranes humaines. L'épaisseur est la même.

B. — SUR UNE TECHNIQUE SPÉCIALE POUR L'EXÉCUTION DE LA RÉACTION DE WASSERMANN

A. — L'Antigène (1).

L'instabilité des antigènes employés pour la réaction de Wassermann est bien connue. Or Boas, qui se sert d'un extrait

(1) *Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1913, t. 2, n° 13.

de cœur humain, le renouvelle chaque semaine. Bien que la précaution semble exagérée, c'est un fait indiscutable qu'un antigène, qui est un extrait alcoolique, a une tendance à s'altérer.

En considérant que les substances les plus altérables, comme les toxines, se gardent longtemps quand on les sèche, j'ai appliqué ce principe à l'antigène de la réaction de Wassermann. J'ai séché et pulvérisé le cœur humain et j'ai conservé cette poudre dans un flacon brun et fermé au moyen d'un bouchon muni d'un dessiccateur (chaux vive). Ensuite j'ai titré cette poudre et trouvé qu'une quantité de 30-40 milligrammes, épuisée par 5 cent. cubes d'alcool à 96 p. 100, donne un antigène excellent. Je l'ai comparé avec un extrait syphilitique, que j'avais reçu du laboratoire de Wassermann et avec un extrait de cœur de cobaye; il s'est montré aussi bon, sinon meilleur.

Voici quelques particularités de cet antigène :

1° Fabrication de la poudre. — Le genre d'affection à laquelle le malade a succombé est indifférent; le mieux est cependant de choisir un cœur aussi normal que possible. On ne prend que le tissu musculaire, on le débarrasse du sang et de la sérosité en le pressant dans une serviette de toile et on le divise en petits morceaux (soit avec des ciseaux, soit avec le broyeur de Latapie). On l'étale alors sur des plaques de verre en couches très minces, que l'on sèche à l'air à une température de 37-50° (par exemple dans l'étuve, dans un stérilisateur, de préférence dans l'appareil de Faust-Heim). L'essentiel est d'éliminer l'eau aussi rapidement que possible afin d'éviter la putréfaction. On obtient des lames minces, cassantes, que l'on peut pulvériser dans un mortier, un peu difficilement sans doute, mais pourtant très finement. On garde la poudre à sec.

2° Conservation. — Une poudre, fabriquée et conservée comme je viens de l'exposer, a été employée à plusieurs reprises pour la réaction de Wassermann, et elle s'est montrée cinq ans après sa fabrication d'aussi bonne qualité qu'au commencement. Il arrive quelquefois qu'une poudre excellente fournisse contre toute attente un extrait qui montre une action anticomplémentaire trop forte. Il suffit alors de sécher de nouveau la poudre pour faire disparaître ce défaut.

3° QUANTITÉS DE POUDRE ET D'ALCOOL POUR OBTENIR EXTEMPORANÉMENT UN BON EXTRAIT. — Ces quantités sont remarquablement constantes avec des cœurs même divers et se chiffrent toujours à 30-40 milligr. (ordinairement 40 milligr.) pour 5 cent. cubes d'alcool à 96 p. 100. (Depuis quelques mois, j'ai employé la poudre préparée de même avec un *cœur de bœuf*, et celle-ci s'est montrée aussi très utilisable dans les proportions mentionnées.)

4° FABRICATION DE L'EXTRAIT DE POUDRE. — On agite la poudre et l'alcool dans les proportions indiquées pendant dix minutes, dans un tube muni d'un bouchon en caoutchouc, soit au moyen d'un appareil, soit à la main. On filtre sur du papier filtre ordinaire et l'extrait est prêt à l'usage. Il n'y a aucun motif pour agiter plus longtemps, ce qui n'offrirait non plus aucun inconvénient.

L'influence du temps durant lequel on agite est bien démontrée dans l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — 30 milligrammes de poudre sont agités dans 5 cent. cubes d'alcool pendant cinq, dix, quinze, vingt, et trente minutes. On fait la réaction de Wassermann avec ces extraits en laissant le complément et le sérum positif constants, mais en diminuant la quantité d'extrait (Pour les détails du Wassermann, je renvoie au passage y relatif) Dans tous les tubes sont placés 0 c. c. 2 de complément (dilué 1 : 10) et 0 c. c. 5 de sérum positif chauffé (dilué 1 : 5) A_5 = antigène obtenu en agitant cinq minutes, etc. Sa dilution est toujours 1 : 5.

Le résultat est indiqué dans le tableau n° 1.

TABLEAU I.

QUANTITÉS d'antigène diluées 1 : 5	RÉSULTATS DES WASSERMANN AVEC LES ANTIGÈNES				
	A_5	A_{10}	A_{15}	A_{20}	A_{30}
c. c. 0,3	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H nulle.
0,2	»	»	»	»	»
0,15	»	»	»	»	»
0,1	»	»	»	»	»
0,05	*H. complète.*	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.
0,025	»	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.
0,01	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*

La majorité des substances actives passe donc dans l'alcool déjà en cinq minutes, mais la totalité en dix minutes.

De même qu'on peut garder l'extrait alcoolique, préparé selon la technique usuelle, de même on peut conserver l'extrait alcoolique obtenu par la technique que j'ai décrite. J'ai gardé un antigène pendant deux mois dans la glacière, sans qu'il ait perdu de qualité pendant ce laps de temps. L'idéal est pourtant de préparer chaque fois l'extrait extemporanément; et on peut le faire sans inconvénient, car j'ai démontré que les extraits de poudre, préparés à des moments divers, ont une composition suffisamment constante.

Le tableau II l'établit distinctement.

EXPÉRIENCE. — L'expérience est calquée sur la précédente.

J'ai dû employer 0 c. c. 3 de complément (dilué à 1/10e). Elle a eu lieu le 25 janvier 1918.

A_1 a été préparé le 21 décembre 1917. . . Agité dans un appareil.
A_2 — 28 — . . . —
A_3 — 23 janvier 1918 . . . . —
A_4 — 25 — . . . . Agité à la main.

TABLEAU II.

QUANTITÉS d'antigène diluées 1 : 5	RÉSULTATS DES WASSERMANN AVEC LES ANTIGÈNES			
	A_1	A_2	A_3	A_4
c. c. 0,2	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.
0,15	»	»	»	»
0,1	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. presque nulle.	H. nulle.
0,05	H. presque complète.	H. presque complète.	H. presque complète.	H. nette.
0,025	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*
0,01	»	»	»	»

Il est évident qu'il n'y a aucune différence entre A_1, A_2 et A_3 et celle que montre A_4 est tellement minime qu'elle peut être négligée, sinon elle démontrerait la supériorité de l'agitation à la main.

5° L'ACTION HÉMOLYTIQUE DE L'EXTRAIT. — Elle est le plus souvent nulle, mais, quand elle se montre par hasard, elle ne gêne pas la réaction, parce qu'elle est annulée déjà par une petite quantité de sérum, par exemple par la quantité d'alexine qui est trop petite pour dissoudre les hématies sensibilisées. On supprime cette action hémolytique de la poudre en la séchant de nouveau.

6° ACTION ANTICOMPLÉMENTAIRE. — Elle est minima quand on s'en tient aux quantités indiquées.

B. — Le système hémolytique.

Il se compose, en dehors de l'alexine, d'hématies de mouton, sensibilisées pendant deux heures avec quatre unités d'ambocepteur. Celui-ci est conservé, stérile, dans de petites ampoules dans la glacière. On peut le considérer comme restant constant.

Des recherches m'ont appris qu'une sensibilisation avec quatre unités suffit amplement pour fournir des hématies qui se dissolvent avec une quantité d'alexine minima. La sensibilisation se fait toujours à la glacière, afin de prévenir autant que possible l'agglutination éventuelle des hématies, qui pourrait entraver l'action du complément.

Les tableaux III et IV donnent les résultats de quelques expériences, qui confirment le bien-fondé de l'affirmation ci-dessus.

EXPÉRIENCE. — Titre de l'ambocepteur : 1 : 800 (1 unité = 1/800e de cent. cube de ce sérum) [1]. Durée de la sensibilisation : deux heures. Les hématies sont centrifugées et le sédiment est dilué avec du sérum physiologique de façon à obtenir une dilution de chromocytes à 5 p. 100.

Chaque tube contient 0 c. c. 5 d'hématies sensibilisées tenues en suspension et des quantités diverses de complément. Volume total : 2 c. c. 5.

(1) Pour prévenir un malentendu, je signalerai qu'il faut entendre, par une unité d'ambocepteur, la plus petite quantité d'un sérum hémolytique qui amène l'hémolyse complète de 1 cent. cube d'une dilution d'hématies à 5 p. 100 (c'est-à-dire 5 cent. cubes du *sédiment* des globules rouges lavées, dilués jusqu'à 100 cent. cubes), en présence de 1 cent. cube d'alexine de cobaye, diluée 1 : 10, le tout complété à un volume de 5 cent. cubes avec du liquide physiologique, après un séjour d'une heure au bain-marie à 37° ou de deux heures dans l'étuve à 37°.

Tableau III.

Résultat après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie.

Le liquide, qui est resté après que les hématies sensibilisées ont été centrifugées, ne donne plus d'hémolyse.

QUANTITÉS d'unités d'ambocepteur (titre 1 : 800)	QUANTITÉS DE COMPLÉMENT (DILUÉ 1 : 10) EN CENT. CUBES							
	0.5	0,4	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0
1	H. complète.	H. complète.	*H. complète.*	H. presque compl.	H. nette	H. presque nulle.	H. nulle	H. nulle
2	»	»	»	*H. complète.*	H. presque compl.	H. presque nulle.	»	»
3	»	»	»	»	»	»	»	»
4	»	»	»	»	»	»	»	»
8	»	»	»	»	»	»	»	»

Expérience. — Titre de l'ambocepteur 1 : 3.200. Durée de la sensibilisation : une heure et demie. Pour le reste, comme dans l'expérience précédente.

Tableau IV.

Résultat après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie.

Le liquide, qui est resté après que les hématies sensibilisées ont été centrifugées, ne donne plus d'hémolyse.

QUANTITÉS d'unités d'ambocepteur (titre 1 : 3200)	QUANTITÉ DE COMPLÉMENT (DILUÉ 1 : 10) EN CENT. CUBES						
	0,3	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0
1	H. nette.	H. nette	H. faible	H. presque nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.
2	H. presque compl.	H. presque compl.	H. presque compl.	H. nette.	H. presque nulle.	»	»
3	H. complète.	H. complète.	*H. complète.*	H. presque compl.	H. faible	»	»
4	»	»	»	»	»	»	»
8	»	»	»	»	»	»	»

Bain-marie pour l'exécution d'une réaction de Bordet-Gengou en général ou pour le Wassermann en particulier.

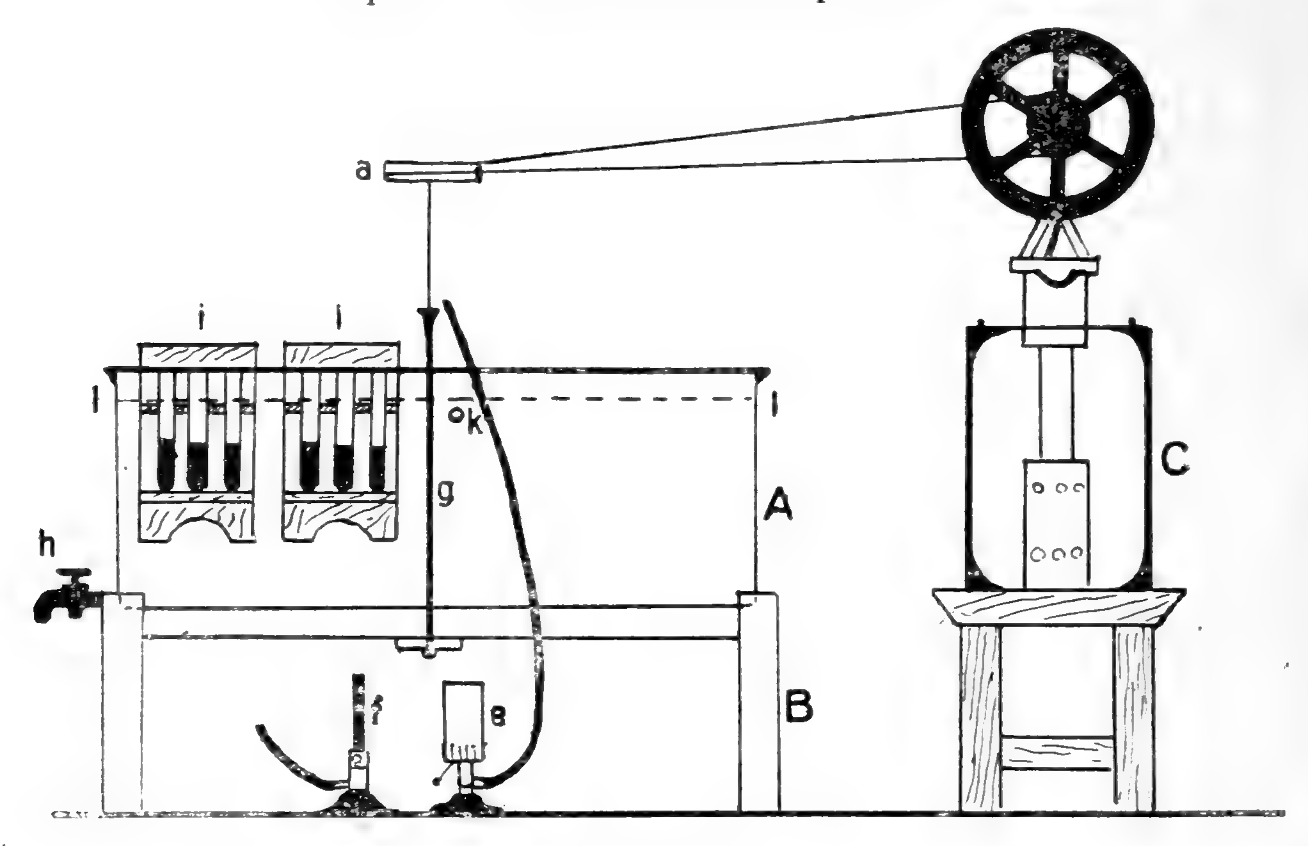


FIGURE 2.

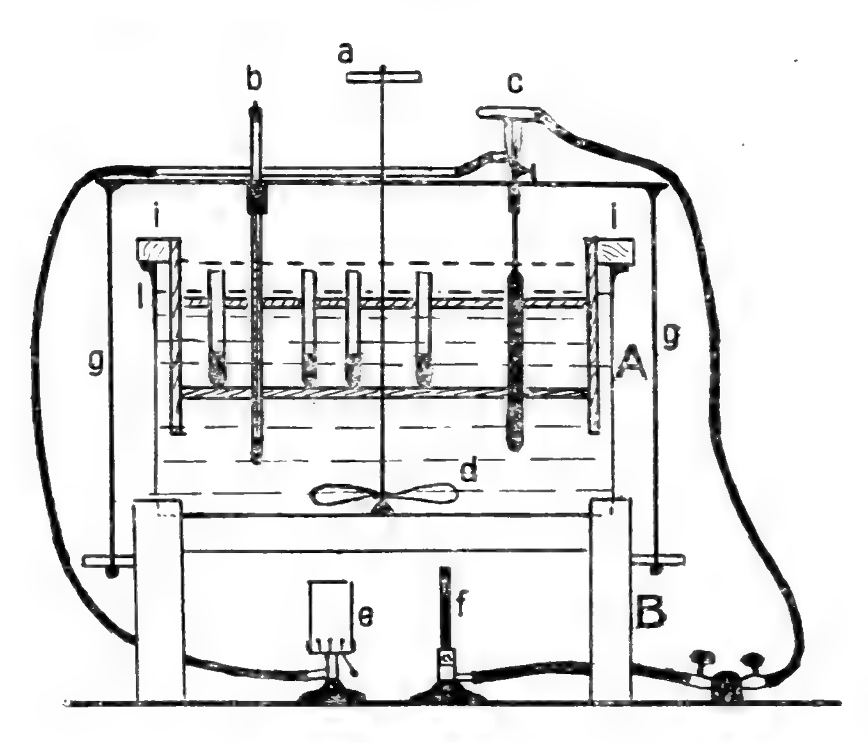


FIGURE 3.

FIG. 2 et 3. — A, bain-marie en fer galvanisé laqué (hauteur environ 20 centimètres, largeur et longueur d'après la nécessité); fig. 2, vue longitudinale; fig. 3, vue transversale (coupes demi-schématiques).

B, pied de fer.

C, petit moteur à air chaud : *a*, poulie pour transmettre l'action du moteur aux ailes (*d*, fig. 3) pour mettre l'eau en mouvement; *g*, monture pour fixer *b* (thermomètre), *a* et *c* (thermo-régulateur) ; *e*, bec d'Argan (pour la régulation) ; *f*, bec de Bunsen (pour chauffer l'eau au commencement); *l*, niveau de l'eau; *i*, porte-tubes; *k*, tube pour laisser s'écouler le superflu d'eau; *h*, le robinet.

Aussi quand on exécute ces expériences avec plus de 8 unités, par exemple 10, 12, 16, on ne réussit pas à diminuer davantage la quantité d'alexine qui est nécessaire pour obtenir l'hémolyse complète. La quantité minima du complément, donnant l'hémolyse complète *après un séjour d'une demi-heure dans le bain-marie à 37°*, s'atteint donc déjà avec 3-4 unités. L'emploi de plus d'unités n'est pas recommandable parce que alors le pouvoir agglutinant du sérum interfère désavantageusement. Il n'est pas non plus préférable de laisser les tubes plus longtemps dans le bain-marie ; la quantité minima du complément est par cela abaissée un peu, mais la fixation de la limite entre hémolyse complète et presque complète est rendue plus difficile.

Me basant sur ces expériences j'emploie pour le Wassermann, ainsi que pour toutes les réactions qui sont fondées sur le principe de Bordet-Gengou, le système hémolytique décrit.

C. — Chauffage au bain-marie.

J'ai toujours été étonné de voir placer les tubes dans l'étuve.

Une réaction aussi précise que la déviation du complément exige également une température précise et constante. L'air dans l'étuve a une température différente suivant qu'on y place plus ou moins de tubes. Le chauffage des tubes se fait aussi très lentement.

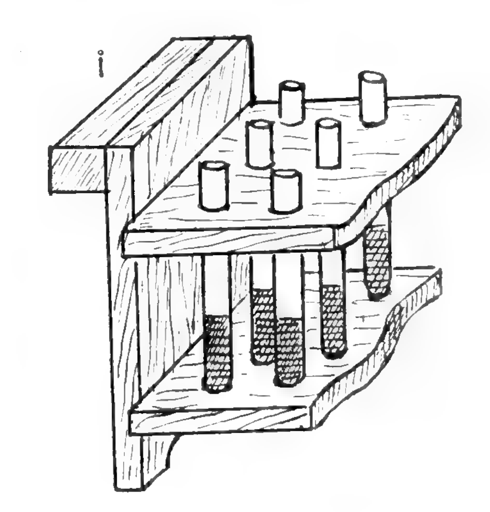


FIGURE 4.

Partie du porte-tubes qui montre la saillie *i*, laquelle doit reposer sur les bords du bain-marie.

J'emploie pour ces motifs, depuis des années déjà, un bain-marie, qui a le mérite de communiquer très rapidement aux tubes la température de l'eau ambiante.

La durée de la réaction est de ce fait diminuée de la moitié de celle qui est nécessaire dans l'étuve.

Je fais maintenant usage d'un bain-marie du modèle représenté dans les figures 2, 3 et 4.

D. — Dispositif de la réaction.

Elle se rapproche de la méthode originale de Wassermann, avec la modification y apportée par Sormani (1). Elle présente quelque ressemblance avec la méthode de Wigger-Boelens (2) et avec celle décrite par Kaup et Kretschmer (3) dans ces derniers temps.

Les réactifs employés sont :

L'antigène : chaque fois préparé avec de la poudre de cœur

(1) Nederl. Tijdschr. voor Geneesk., 1909; *Zeitsch. f. Immun. Forschung*, 1911, *Münch. med. Woch.*, 1914.

(2) *Compte rendu annuel du laboratoire central d'Hygiène publique à Utrecht*, 1914.

(3) *Münch. med. Woch.*, 1917, n° 5; *Archiv f. Hygiene*, 1917, **87**.

TABLEAU

	DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ MINIMA DE COMPLÉMENT DONNANT L'HÉMOLYSE COMPLÈTE **en présence** de l'antigène n° 1 (q_1)						
NUMÉRO DU TUBE . . .	1	2	3	4	5	6	
Antigène n° 1 dilué 1 : 5 en cent. cubes.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Liquide physiologique en cent. cubes	0,5	0,6	0,2	0,3	0,9	1	
Complément dilué 1 : 10 en cent. cubes.	0,5	0,4	**0,3**	0,2	0,1	0	
Demi-heure en bain-marie à 37°.							
Hématies sensibilisées (suspension à 2 1/2 0/0) en cent. cubes	1	1	1	1	1	1	
Demi-heure en bain-marie à 37°.							
xemple d'un résultat. . .	Hémolyse complète.	Hémolyse complète.	**Hémolyse complète.**	Hémolyse partielle.	Hémolyse nulle.	Hémolyse nulle.	Hé cor
						Résultat : q_1 =	

humain (ou de bœuf) (1), comme je l'ai décrit précédemment ; il est toujours employé à une dilution 1 : 5.

Le complément : frais, mais pourtant préparé depuis quelques heures ; employé à une dilution 1 : 10.

Le sérum à examiner : toujours chauffé, employé à une dilution 1 : 5.

(*Le liquide cérébro-spinal* est aussi chauffé, bien qu'il ne contienne ordinairement pas de complément ; il peut alors être employé, aussi avec la méthode décrite, non dilué.)

Les hématies sensibilisées : Elles sont préparées comme suit : du sédiment des hématies lavées on fait une suspension à 5 p. 100, par exemple 100 cent. cubes. On ajoute la même

(1) De cette seconde poudre je me bornerai à dire quelle me paraît aussi bonne que la première, mais je n'ai pu, jusqu'à présent, expérimenter la durée de sa conservation.

ve préparatoire.

	TERMINATION DE LA QUANTITÉ MINIMA OMPLÉMENT DONNANT L'HÉMOLYSE COMPLÈTE *en présence* de l'antigène n° 2 (q_2)				DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ MINIMA DE COMPLÉMENT DONNANT L'HÉMOLYSE COMPLÈTE *en l'absence* d'antigène (p)			
	3a	4a	5	6a	7	8	9	10
	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
	0,7	0,8	0,9	1	1,2	1,3	1,4	1,5
	0,3	0,2	0,1	0	0,3	**0,2**	0,1	0
Demi-heure en bain-marie à 37°.								
	1	1	1	1	1	1	1	1
Demi-heure en bain-marie à 37°.								
olyse plète.	H. presque complète.	Hémolyse partielle.	Hémolyse nulle.	Hémolyse nulle.	Hémolyse complète.	**Hémolyse complète.**	H. presque complète.	Hémoly nulle.
0,4 ; p = 0,2.								

quantité, donc 100 cent. cubes, de la sensibilisatrice antimouton, diluée de telle façon que chaque centimètre cube contienne quatre unités (ainsi un ambocepteur au titre 1 : 1.600 (1) sera dilué quatre cents fois et on prendra 100 cent. cubes de la solution). On peut naturellement ajouter aussi l'ambocepteur non dilué (dans l'exemple total 0 c. c. 25), mais il m'a paru que la dilution est favorable à la sensibilisation. On mêle soigneusement et on laisse sensibiliser à la glacière pendant deux heures, de préférence pas plus longtemps. Puis les hématies sont centrifugées et le liquide surnageant est éliminé. On prépare avec les hématies une suspension à 2,5 p. 100 et pas à 5 p. 100, afin de faciliter l'égalisation des volumes dans tous les tubes; dans l'exemple choisi on ajoutera donc 200 cent. cubes de liquide physiologique au sédiment des hématies sensibilisées.

L'avantage de cette façon d'agir est qu'on n'a pas à craindre l'influence entravante éventuelle du sérum du lapin, qui pourrait donner, surtout quand on a un ambocepteur avec un titre peu élevé, une réaction positive, et qu'on opère toujours dans les conditions les plus comparables.

Epreuve préparatoire.

Le titrage de l'ambocepteur ne se fait pas pour chaque réaction. Il suffit de l'exécuter seulement de temps à autre, parce que le sérum, conservé dans des ampoules à la glacière, garde longtemps son titre fixe.

On fait au contraire deux titrages du complément, l'un en l'absence et l'autre en présence de l'antigène, dont on prélève la quantité utilisée pour une réaction, c'est-à-dire toujours 0 c. c. 5 de la dilution 1 : 5.

On obtient par ces titrages deux valeurs du complément, qu'il faut distinguer, à savoir : 1° la quantité *minima* de l'alexine, qui suffit exactement pour dissoudre complètement 1 cent. cube de la suspension des hématies, en *l'absence* de l'antigène, désignée par p, et 2° la quantité *minima* de l'alexine, qui agit de même en *présence* de l'antigène, dénommé q.

(1) On peut, par ce procédé, employer aussi des sensibilisatrices dont le titre est plus bas, comme le démontre l'expérience avec l'ambocepteur du titre de 1 : 800.

Ordinairement q est plus grand que p, c'est-à-dire que l'antigène fixe lui-même une certaine quantité de l'alexine, notamment une quantité $q - p$ cent. cubes. Rarement $q = p$, quand l'antigène n'agit pas anticomplémentairement.

L'exécution pratique apparaît le mieux dans le tableau V, lequel contient aussi un exemple de résultat. Pour plus de sûreté, on exécute la réaction avec deux antigènes, extraits de poudres différentes (1). Pour ne pas vanter la méthode, j'ai fait rentrer dans le tableau deux antigènes qui ne se comportent pas de la même façon. Mais ce n'est pas la règle. Quand on a un extrait, qui se montre un peu plus anticomplémentaire que l'autre, on peut éventuellement chercher à les égaliser en diminuant ou augmentant la quantité de poudre qu'on emploie pour l'extraction.

Je n'ai trouvé aucun avantage à pousser plus loin la graduation des quantités d'alexine que je ne l'ai fait dans l'épreuve préparatoire. Les petites fautes de technique, inévitables, pourraient influencer d'une façon trop sensible les résultats obtenus. Il est de rigueur absolue de ne constater l'hémolyse complète, que si le liquide contenu dans le tube ne montre pas le moindre trouble ou la moindre opalescence, provenant de quelques hématies non dissoutes.

La réaction proprement dite.

L'idéal serait, dans la pratique de la réaction de Wassermann, de rechercher le pouvoir anticomplémentaire des sérums à examiner, ainsi que celui de l'antigène. Mais cela ne se fait pas et ce n'est pas nécessaire, parce que les sérums ne sont qu'exceptionnellement notablement anticomplémentaires aux doses usuelles. On peut d'ailleurs se fier au tube-contrôle contenant la dose double de sérum.

Or, le sérum ne fixant pas de complément en l'absence d'antigène, on obtient la réaction la plus sensible en le mêlant à l'antigène, puis ajoutant la quantité de complément q (obtenue dans l'épreuve préparatoire). Car dans ce tube il n'y a plus que la

(1) On peut naturellement aussi employer pour la méthode décrite des extraits préparés autrement.

quantité p de complément pouvant agir parce que l'antigène prend $q - p$ (1). Un sérum, un peu positif, fixant donc seulement peu de complément, est alors reconnu avec certitude. Un sérum négatif, au contraire est découvert de même, parce que la quantité p suffit précisément pour donner l'hémolyse complète. Il y a cependant deux éventualités à envisager :

1° Le sérum peut agir anticomplémentairement à un degré très léger, sans qu'il se manifeste dans le tube-contrôle. Un sérum complètement négatif peut alors se montrer légèrement positif. C'est le cas surtout avec les sérums qui ne sont pas tout à fait frais.

2° Le sérum normal peut présenter à un certain degré la réaction de Wassermann, parce que celle-ci est liée à une particularité que possède vraisemblablement tout sérum et qui n'est que fortement augmentée dans un sérum syphilitique.

Les réactifs dans le tube mentionné (voir le tableau VI, les tubes 3, 3*a*, 3*b*, etc. et 5, 5*a*, 5*b*, etc.) sont par conséquent combinés dans des proportions qui peuvent rendre la réaction trop sensible.

Ils peuvent donner lieu à des résultats inexacts en ce sens qu'un sérum absolument négatif pourrait produire une réaction plus ou moins distinctement positive.

Pourtant *la pratique* a appris qu'on peut obtenir de bons résultats avec la combinaison décrite, surtout quand le sérum est frais, car le sérum diminue ordinairement le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène. Un sérum négatif est alors démontré, comme il le faut, par l'hémolyse complète. Mais il n'est pas permis de s'y fier.

Pour compenser l'hypersensibilité dans ce tube, j'y joins toujours un second tube, contenant une quantité d'alexine qui est suffisante pour reconnaître avec certitude un sérum négatif et en même temps assez petite pour empêcher un sérum positif de passer inaperçu. Cette quantité est basée sur les résultats obtenus dans l'épreuve préparatoire et est calculée d'après les considérations suivantes :

Le sérum à examiner est contrôlé au point de vue de son

(1) Je suis convaincu qu'un tel calcul avec des substances colloïdes ne doit pas être en concordance parfaite avec les faits, mais la pratique m'a appris qu'on pouvait s'en contenter.

action anticomplémentaire en mettant une dose double en contact avec la quantité q de l'alexine, ce qui pratiquement revient à mettre la dose simple en présence d'une quantité $1/2\ q$ d'alexine. Or q le plus souvent étant plus petit que $2\ p$ (il doit l'être de préférence, comme je le montrerai bientôt) $1/2\ q$ est aussi plus petit que p. Ce qui revient à dire que le contrôle du sérum se fait par là d'une manière plus sensible que lorsqu'on met le sérum à dose simple en contact avec p.

Alors quand le tube de contrôle pour le sérum montre l'hémolyse complète, il n'en résulte qu'une quantité p du complément est restée libre. Le sérum dans la dose double *peut* donc (bien que cela ne soit pas nécessaire) avoir annulé une quantité de complément se montant à $q-p$, mais pas plus. Dans ce dernier cas on n'apercevrait pas l'hémolyse complète. La dose simple de sérum *peut* dans ce cas fixer de même une quantité $1/2(q-p)$ du complément. Il s'ensuit que dans le premier tube (dans le tableau VI les tubes 3, 3*a*, 3*b*, etc. et 5, 5*a*, 5*b*, etc.) la combinaison de sérum et d'antigène (faire abstraction d'une influence réciproque de ces réactifs) peut fixer spécifiquement la quantité suivante de complément :

$$q-p \text{ [par l'antigène]} + 1/2\ (q-p) \text{ [par le sérum]} = 1\ 1/2 q - 1\ 1/2\ p.$$

Cette quantité est égale à zéro lorsque $q=p$; en d'autres termes, quand ni l'antigène, ni le sérum ne fixent de complément. Mais, l'épreuve préparatoire l'indique, le plus souvent q est $> p$. Dans ce cas $1\ 1/2\ q - 1\ 1/2\ p$ peut être suffisant pour entraver l'hémolyse, à savoir lorsque $q - (1\ 1/2\ q - 1\ 1/2\ p)$ est $< p$. Pour ce motif, j'ajoute dans le second tube, au lieu de la quantité q, $q + 1/2\ p$ de complément. Les conditions dans ce tube étant les mêmes que dans le premier, la combinaison sérum-antigène peut absorber ici aussi la quantité $1\ 1/2\ q - 1\ 1/2\ p$, mais il reste alors dans ce tube :

$$q + 1/2 p - (1\ 1/2\ q - 1\ 1/2 p) = 2\ p - 1/2\ q.$$

Quand $q=p$, ce tube contient $1\ 1/2\ p$ de complément, quantité suffisante pour donner l'hémolyse complète en présence

Tableau VI. — **Réaction proprement dite.** (Résult

CONTENU DES TUBES —	SÉRUM POSITIF (CONTROLE)						SÉRUM NÉGATIF (CONTROLE) Pas tout à fait frais					
	CONTROLE du double de la dose du sérum		WASSERMANN avec antigène n° 1		WASSERMANN avec antigène n° 2		CONTROLE du double de la dose du sérum		WASSERMANN avec antigène n° 1		WASSERM avec antigène	
uméro des tubes	1	(2)	3	4	5	6	1 *a*	(2 *a*)	3 *a*	4 *a*	5 *a*	6
Sérum dilué 1 : 5) n cent. cubes.	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,
ntigène n° 1 dilué 1 : 5) n cent. cubes.	—	—	0 5	0,5	—	—	—	—	0,5	0,5	—	–
ntigène n° 2 dilué 1 : 5) n cent. cubes.	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5	0,
Complément dilué 1 : 10) n cent. cubes.	0,3 (q_1)	0,4 (q_2)	0,3 (q_1)	0,4 ($q_1 + 1/2\,p$)	0,4 (q_2)	0,5 ($q_2 + 1/2\,p$)	0,3 (q_1)	0,4 (q_2)	0,3 (q_1)	0,4 ($q_1 + 1/2\,p$)	0,4 (q_2)	0, (q_2+
quide physiologique n cent. cubes.	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	—	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	–
Demi-heure en bain-marie à 37°.												
ématies sensibilisées uspension de 2 1/2 0/0) n cent. cubes.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Demi-heure en bain-marie à 37°.												
xemple d'un résultat.	H. compl.	H. compl.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle	H. nulle.	H. compl.	H. compl.	H. pr. compl.	H. compl.	H. partielle.	H com

Disposition des tubes dans les porte tubes :

Contrôles des sérums → [1] [2] [1*a*] [2*a*] etc... [7] ← Contr
Tubes contenant ant. n° 1 → [3] [4] [3*a*] [4*a*] etc... [8] ← —
— — n° 2 → [5] [6] [5*a*] [6*a*] etc .. [9] ← —

ve préparatoire : $q_1 = 0{,}3$; $q_2 = 0{,}4$; $p = 0{,}2$ cent. cubes.)

SÉRUM A EXAMINER N° 1					SÉRUM A EXAMINER N° 2						CONTROLES RESTANTS		
OLE le de se um	WASSERMANN avec antigène n° 1		WASSERMANN avec antigène n° 2		CONTROLE du double de la dose du sérum		WASSERMANN avec antigène n° 1		WASSERMANN avec antigène n° 2				
(2 *b*)	3 *b*	4 *b*	5 *b*	6 *b*	1 *c*	(2 *c*)	3 *c*	4 *c*	5 *c*	6 *c*	7	8	9
1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—	—
—	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	0,5	—
—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—	0,5
0,4 (q_2)	0,3 (q_1)	0,4 ($q_1 + 1/2\,p$)	0,4 (q_2)	0,5 ($q_2 + 1/2\,p$)	0,3 (q_1)	0,4 (q_2)	0,3 (q_1)	0,4 ($q_1 + 1/2\,p$)	0,4 (q_2)	0,5 ($q_2 + 1/2\,p$)	0,2 (p)	0,3 (q_1)	0,4 (q_2)
0,1	0,2	0,1	0,1	—	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	—	1,3	0,7	0,6
Demi-heure en bain-marie à 37°.													
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Demi-heure en bain-marie à 37°.													
H. compl.	H. compl.	H. compl.	H. compl.	H. compl.	H. compl.	H. compl.	H. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	H. compl.	H. compl.	H. comp
Interprétation : négatif.					Interprétation : positif.								

ystème hémolytique.
ntigène n° 1.
— n° 2.

d'un sérum négatif. Aussi quand ce sérum a une tendance à produire une réaction de Wassermann « normale », « pseudo-spécifique », une quantité de $1/2\ p$ peut être fixée, sans qu'il se montre entravement de l'hémolyse.

(Quand le sérum avec l'antigène fixe plus de $1/2\ p$, la réaction ne peut plus être considérée comme normale.)

Un sérum, qui ne peut donner qu'une réaction faiblement positive, n'a à fixer avec l'antigène que la quantité p pour être reconnu, parce que le reste $1/2\ p$ du complément ne conduit pas à l'hémolyse complète. Tandis qu'un sérum qui réagit d'une façon nettement positive fixe très facilement $1\ 1/2\ p$ du complément.

Mais c'est une rareté que $q = p$, ordinairement q est $> p$. Or q ne doit pas être indéfiniment plus grand que p ; il y a des bornes, qui peuvent être fixées.

Nous avons démontré qu'il reste dans le second tube une quantité de complément se montant à $2\ p - 1/2\ q$. Alors il va sans dire qu'il doit rester dans ce tube, quand les deux réactifs ont absorbé la quantité de complément que comporte leur action anticomplémentaire, la quantité p. S'il en reste moins, un sérum négatif se montrera plus ou moins positif. Il en résulte que :

$2\ p - 1/2\ q$ doit être égal ou plus grand que p.

$$2p - 1/2\ q \geqq p$$
$$4p - q \geqq 2p$$
$$2p - q \geqq 0.$$

Il en résulte : $q \leqq 2p.$

Ce qui revient à dire que l'antigène doit avoir une composition telle, que la quantité de complément, qui est en état de dissoudre complètement les hématies sensibilisées en sa présence, s'élève tout au plus au double de la quantité de complément qui produit l'hémolyse complète en son absence. Ou en d'autres termes : l'antigène à la dose usuelle doit tout au plus annuler une quantité de complément, qui se monte à la quantité minima de complément qui détermine par elle-même l'hémolyse complète.

Supposons que q soit égal à $2\ p$. Dans ce cas $q + 1/2\ p$ équi-

vaudra tout au plus à $2\,1/2\,p$. Ceci ne peut arriver quand la *combinaison* sérum-antigène n'a pas d'action anticomplémentaire. Or p est ordinairement 0 c. c. 2 et alors $2\,1/2\,p = 0$ c. c. 5. Cette dernière quantité est celle qu'on emploie régulièrement dans le Wassermann original, et qui est très bien fixée par un sérum qui est nettement positif. La quantité de complément ajoutée dans le second tube n'est donc certainement pas trop grande et n'est pas non plus trop petite, lorsque $q = p$.

Les extraits préparés avec la poudre répondent à la condition : $q \leqq 2\,p$. Pourtant il se présente parfois que l'antigène agisse un peu trop anticomplémentairement, de sorte que q est $> 2\,p$. C'est ce qui arrive quelquefois quand le système hémolytique est très sensible. Dans ce cas, il y a un certain désaccord entre l'action anticomplémentaire normale de l'antigène et l'action hémolytique anormale du complément. Alors, on peut mener la réaction à bonne fin en employant dans le second tube la quantité $q + p$, pourvu que q ne dépasse pas tout au plus $3\,p$.

En effet : $q + p - (1\,1/2\,q - 1.\,1/2\,p) \geqq p$.

$$2\,1/2\,p - 1/2\,q \geqq p$$
$$5\,p - q \geqq 2\,p$$
$$3\,p - q \geqq 0$$
$$q \leqq 3\,p.$$

Quand q est $> 3\,p$, l'extrait est à rejeter.

Quelque compliqué que paraisse le calcul, l'exécution de la réaction est très simple. Mieux qu'une description, le tableau VI reproduisant aussi un exemple peut le prouver.

On a besoin de 0 c. c. 8 de sérum quand, comme dans l'exemple défavorable choisi, on a affaire à deux antigènes, qui sont anticomplémentaires à différents degrés. Comme il est facile de se procurer des antigènes qui se comportent de la même façon, il en résulte qu'une quantité usuelle de sérum de 0 c. c. 6 sera suffisante. Aussi peut-on se contenter de ne contrôler les sérums qu'avec q_1 quand $q_1 < q_2$. Les tubes (2), (2*a*), (2*b*) sont ainsi facultatifs.

L'interprétation de la réaction peut se faire d'après le schéma indiqué au tableau VII.

Tableau VII.

Schéma pour l'interprétation de la réaction.

QUANTITÉS DE COMPLÉMENT AJOUTÉES DANS LES TUBES		INTERPRÉTATION
q	q + 1/2 p	
Résultat de la réaction.	Résultat de la réaction.	
Hémolyse nulle.	Hémolyse nulle.	Positif.
»	H. presque nulle.	»
»	H. partielle.	»
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, mais douteux.
H. presque nulle.	H. presque nulle.	Positif.
»	H. partielle.	»
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, douteux.
H. partielle.	H. partielle.	Faiblement positif.
»	H. presque complète.	Faiblement positif.
»	H. complète.	Faiblement positif, douteux.
H. presque complète.	H. presque complète.	Pas tout à fait négatif.
»	H. complète.	Négatif.
H. complète.	H. complète.	Négatif.

Les résultats pratiques de la méthode ont démontré avec certitude sa valeur pour le diagnostic de la syphilis.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Juin — N° 6.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — France : 45 francs; Union postale : 55 francs. Prix d'un Numéro : 4 francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921.	France	45 fr.
— — — —	Union Postale.	55 fr.
Prix du numéro, — —		4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs. Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément. Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 6

Pag

Mémoires publiés à l'occasion du Jubilé de Élie Metchnikoff, réunis un volume grand in-8° de 724 pages et 20 pl. en noir et en couleurs, précédés compte rendu du Jubilé du 16 mai 1915, avec portrait de E. Metchnikoff. — Pa Masson et Cie, 50 francs.

35e ANNÉE JUIN 1921 N° 6

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

L'IMMUNITÉ NATURELLE ET ACQUISE CHEZ LA CHENILLE DE *GALLERIA MELLONELLA*

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par S. METALNIKOW.

PESTE

Dans notre premier mémoire (1) nous avons étudié l'immunité de la chenille envers les microbes du groupe A, c'est-à-dire des microbes qui sont à peu près complètement inoffensifs pour les chenilles (tuberculose, diphtérie, tétanos, etc.).

Nous avons démontré que les chenilles luttent contre tous ces microbes par deux moyens : par la phagocytose et par la formation des capsules. C'est pourquoi nous avons pu affirmer que l'immunité naturelle des chenilles est une immunité purement cellulaire.

Pouvons-nous dire la même chose sur l'immunité acquise ? Jusqu'à présent nous savons très peu de chose sur l'immunité acquise des invertébrés et particulièrement des insectes. Sont-ils capables d'élaborer les anticorps et quel rôle jouent ces anticorps dans les processus de la lutte contre les microbes ? Pour résoudre cette question il fallait s'adresser aux microbes patho-

(1) Ces *Annales*, 1920.

gènes pour les chenilles, c'est-à-dire aux microbes du groupe B. Ce groupe contient des microbes contre lesquels les chenilles ont une immunité incomplète (peste, charbon, *Perfringens*, etc.). Elles ne résistent pas à de fortes doses. Par contre, elles supportent des doses plus faibles, mais en tout cas des doses très considérables par rapport aux petites dimensions des chenilles. En premier lieu je me suis adressé à la peste, qui me paraissait particulièrement intéressante.

Le microbe de la peste est un microbe des plus redoutables contre lequel les animaux supérieurs n'ont presque pas de moyens de défense. *Secundo*, la peste est transmise le plus fréquemment par les insectes. Il serait intéressant de savoir comment réagissent ceux-ci contre l'infection pesteuse.

C'est grâce à l'amabilité du D[r] Dujardin-Beaumetz, qui m'a donné l'autorisation de travailler dans son laboratoire et m'a aimablement fourni les cultures pesteuses, que j'ai pu faire une série d'expériences.

Je me fais un plaisir de remercier le D[r] Dujardin-Beaumetz de son aimable concours.

J'ai eu à ma disposition deux cultures : une très virulente, qui donnait l'infection mortelle aux rats par une simple piqûre, l'autre très faible.

Comme d'ordinaire, je préparai deux émulsions : une plus épaisse (une anse de culture épaisse dans 1/2 cent. cube d'eau physiologique), l'autre plus étendue en prélevant une ou deux anses d'émulsion forte et en y ajoutant 1/2 cent. cube d'eau physiologique.

Expériences n° 39. — 10 chenilles reçurent 1/80 c.c. d'une jeune culture de peste très virulente en émulsion faible :

Après 24 heures . . .	9 vivantes, 1 morte;
— 48 heures . . .	9 — 1 morte;
— 5 à 12 jours . .	9 chrysalides et papillons.

Expériences n° 40. — 10 chenilles reçurent 1/80 c.c. d'une jeune culture de peste très virulente (émulsion épaisse, dose forte) :

En 24 heures	6 vivantes, 4 mortes;
— 48 heures	6 —
— 5 à 12 jours. . . .	6 chrysalides et papillons.

En examinant le sang des chenilles infectées, nous avons pu constater que la phagocytose commence aussitôt après l'intro-

duction des microbes. Après quarante-soixante minutes tous les phagocytes sont bourrés de microbes (fig. 1).

Mais il y a encore beaucoup de microbes dans le sang hors

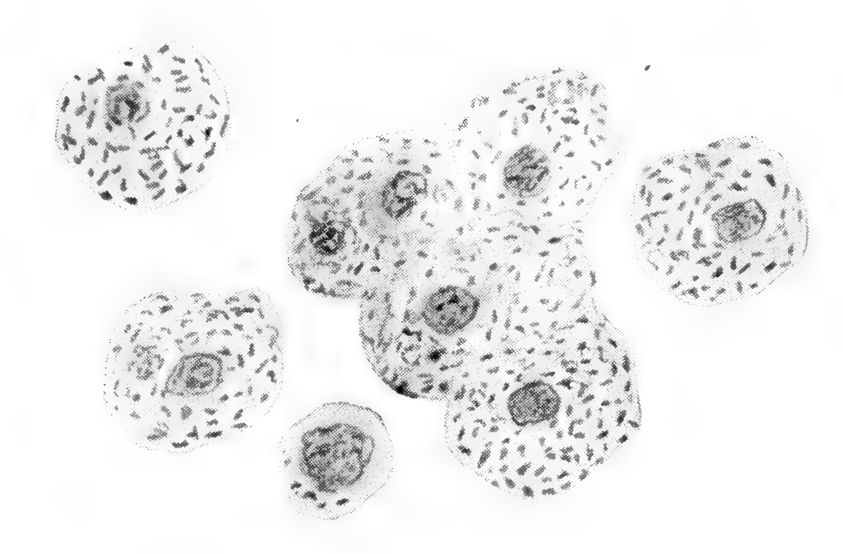


FIGURE 1.

des phagocytes. Après deux à trois heures il se produit une crise dans l'évolution de la maladie.

Chez les chenilles qui se rétablissent dans la suite, tous les microbes sont très vite englobés et digérés.

On trouve dans les phagocytes et leurs agglomérations beau-

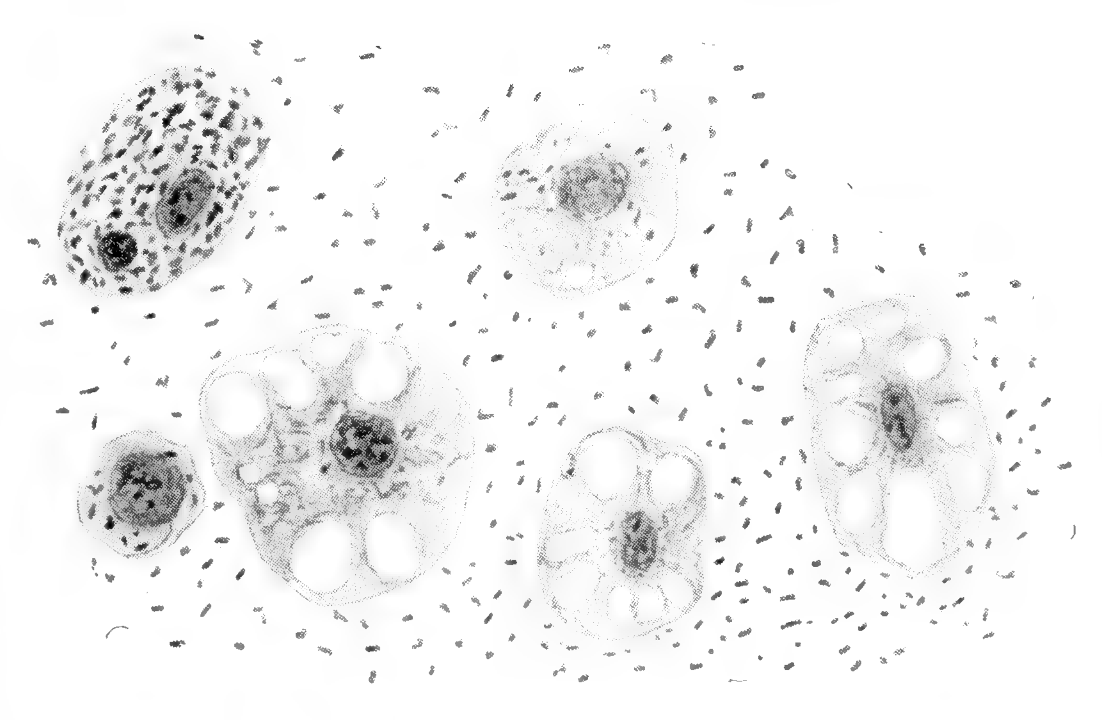


FIGURE 2.

coup de pigments brun noir, qui sont le résultat de l'oxydation et de la digestion intense. Chez les chenilles qui meurent dans la suite, on constate dans les premières trois-quatre heures une aggravation de la maladie. Les microbes pullulent en abondance, malgré la phagocytose intense (fig. 2).

Particulièrement intéressante est la phagocytose pendant l'infection mortelle. Les phagocytes sont bourrés de microbes qui sont sûrement digérés à l'intérieur des phagocytes, car on trouve souvent des vacuoles pigmentées. Mais la phagocytose n'arrête pas l'évolution mortelle de la maladie. L'animal meurt en phagocytant les microbes. Souvent ces faits ont été présentés comme un argument contre la phagocytose et son rôle dans l'immunité.

Dernièrement Paillot, qui a fait des recherches très intéressantes sur l'immunité des chenilles, a exposé des idées semblables (1).

Il écrit : « Les chenilles qui n'offrent pas de résistance aux infections comme par exemple celles de *Pieris brassicæ*, *Vanessa urticæ* sont très sensibles à l'action des bacilles et cependant les micronucléocytes et même les autres éléments du sang les phagocytent activement. Un certain nombre de microbes entomophytes se comportent comme le *B. liparis*; englobés en grand nombre, ils deviennent de véritables parasites pour ces cellules et sont alors pathogènes pour leurs hôtes. Il y a là une indication très nette sinon une preuve que l'immunité la plus active n'est pas le fait de la phagocytose seule mais des réactions humorales. »

Cependant tous ces faits s'expliquent très facilement par la théorie phagocytaire.

Le succès de cette lutte entre les phagocytes et les microbes dépend certainement non pas seulement des phagocytes, qui les englobent, mais aussi de la quantité des microbes injectés et de leur toxicité.

Comme nous l'avons démontré, beaucoup de microbes contiennent des endotoxines très toxiques pour les globules blancs des chenilles. Injectés en grande quantité ils empêchent les phagocytes de s'adapter aux substances toxiques et de digérer les microbes englobés. C'est pourquoi, malgré la phagocytose, il y a destruction des leucocytes et infection mortelle de l'animal.

Si, au contraire, la quantité des microbes injectés n'est pas très grande, les phagocytes s'adaptent facilement et digèrent tous les microbes. Tout cela se passe très vite. Si en trois-quatre

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 1920, p. 425.

heures les phagocytes prennent le dessus, la chenille se rétablit et reste vivante.

Expériences n° 41. — 10 chenilles reçurent 1/80 c.c. d'une jeune culture de peste peu virulente (émulsion épaisse) :

Après 24-48 heures, toutes les chenilles sont vivantes;
— 5-12 jours, chrysalides et papillons.

En examinant le sang des chenilles mourantes et mortes de la peste, nous avons toujours constaté la diminution et souvent la disparition des globules du sang et comme résultat la septicémie.

J'ai fait des expériences analogues avec des cultures peu

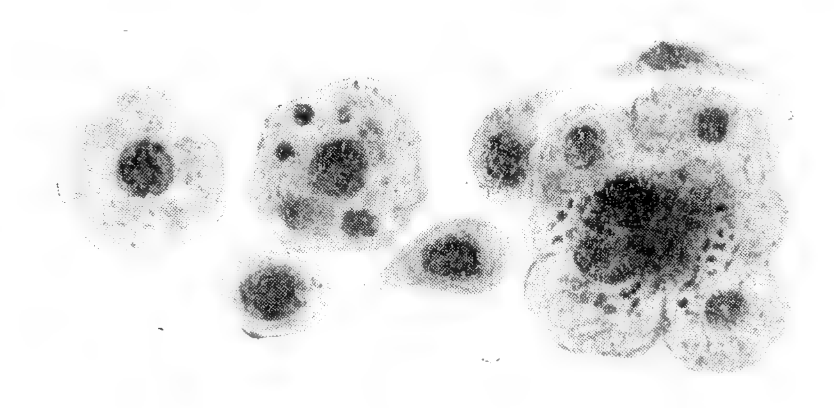


Figure 3.

virulentes. Injectées en doses très grandes elles ne produisaient aucun malaise et les chenilles injectées se rétablissaient très vite.

L'examen du sang démontre une phagocytose et une digestion intense des microbes avec la formation du pigment brun-noir (fig. 3). Sur les coupes j'ai trouvé, dans la cavité du corps et surtout dans la région du cœur, de grandes agglomérations de phagocytes avec des masses de microbes dégénérés et transformés en pigment.

J'ai trouvé aussi les capsules avec le pigment brun-noir à l'intérieur comme dans le cas de la tuberculose, tandis que chez les chenilles tuberculeuses on trouvait toujours une très grande quantité de ces capsules (souvent une dizaine, même plusieurs dizaines sur une coupe); chez les chenilles pesteuses, les capsules sont très rares.

Cela s'explique très facilement par le fait que les microbes pesteux n'ayant pas d'enveloppes cireuses sont plus facilement digérés.

En nous basant sur ces expériences, nous pouvons dire que les chenilles des mites des abeilles possèdent une immunité considérable envers la peste, mais cette immunité n'est pas aussi complète que vis-à-vis de la tuberculose ou la diphtérie.

PNEUMOCOQUES

En cherchant les microbes les plus intéressants pour l'étude de l'immunité acquise, je me suis arrêté sur les pneumocoques.

Le Dr Truche, qui s'en occupe depuis longtemps à l'Institut Pasteur, m'a aimablement fourni différentes cultures de pneumocoque et m'a donné de précieux conseils pour l'étude de ce microbe. Je me fais un plaisir de le remercier ici de son aimable concours.

Mes premières observations me firent croire que les chenilles sont très peu sensibles au pneumocoque et j'étais déjà prêt à abandonner mes recherches sur ce microbe. Pourtant mes expériences ultérieures prouvèrent que mes conclusions n'étaient pas justifiées. Le pneumocoque est un microbe qui perd très facilement sa virulence dans les cultures. Il faut souvent le renforcer par passages sur les animaux.

Des cultures renforcées se montrèrent très virulentes et tuèrent mes chenilles en quinze à vingt-quatre heures.

Mais dans trois à cinq jours ces cultures perdaient de nouveau leur virulence.

J'ai essayé, d'après les indications du Dr Truche, quatre différentes espèces de pneumocoques :

1° Une culture complètement avirulente pour les souris et autres animaux supérieurs;

2° Culture I ;

3° Culture II ;

4° Culture III.

La culture avirulente est aussi inoffensive pour les chenilles. On peut l'injecter en grande quantité sans provoquer aucun malaise.

Les cultures I et II sont virulentes quand elles sont injectées en doses fortes (c'est-à-dire 1/80 cent. cube à 1/40 cent. cube de culture de dix-huit à vingt-quatre heures sur bouillon).

Des doses faibles (1 à 5 anses d'une jeune culture en bouillon dans 1/2 cent. cube d'eau physiologique) ne donnent pas la maladie.

La virulence de ces cultures est très variable et fragile, souvent elle s'atténue très vite et elle peut se renforcer seulement par passages sur les animaux. Beaucoup plus virulente est la culture III ; sa virulence est plus stable et se conserve plus longtemps.

Injectée même en dose très petite (1/160 cent. cube) elle donnait toujours l'infection mortelle.

Les chenilles contaminées trois à cinq heures après l'infec-

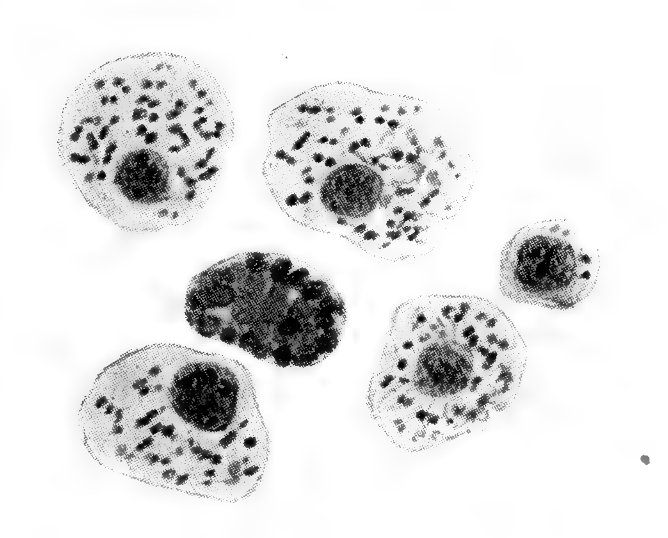


FIGURE 4.

tion se montraient très malades. Elles remuaient très lentement et devenaient brun-noir. Mauvais signe! Car le noircissement du sang chez les chenilles est toujours le résultat d'une septicémie.

On sait qu'il est possible de suivre très exactement tous les stades de l'infection en prélevant du sang à l'aide d'un tube bien effilé à travers le tégument de l'insecte. Voici ce qu'on observe lorsqu'on injecte dans la cavité générale de la chenille la culture du pneumocoque.

Dans les moments qui suivent l'introduction des microbes non virulents, on constate toujours que le sang de la chenille renferme une grande quantité de leucocytes qui englobent ces pneumocoques.

Au bout de une à deux heures tous les phagocytes sont bourrés de pneumocoques. La grande partie des microbes est déjà digérée et transformée en pigment brun-noir (fig. 4).

Trois à cinq heures après l'injection les phénomènes de la phagocytose et de la destruction des microbes est encore plus intense. C'est sur les coupes qu'on observe encore mieux tous les stades de la destruction des microbes dans l'organisme des chenilles.

A côté de la phagocytose on trouve toujours l'agglomération des leucocytes autour des microbes et la formation des cellules géantes et des capsules. Cet accolement des leucocytes, cette formation des agglomérations autour des microbes joue certainement, comme dans la tuberculose, un très grand rôle dans l'immunité des chenilles. La plus grande partie des microbes est digérée et détruite non dans les phagocytes isolés, mais dans ces groupes de phagocytes. Je pus observer quelquefois la formation des agglomérations et la digestion des microbes, même dans les cas où la phagocytose faisait défaut.

Nous avons ici certainement un exemple d'une coopération cellulaire. Quand les cellules isolées, les leucocytes ne peuvent pas attaquer et se défendre contre un parasite dangereux, elles s'amassent, se réunissent ensemble pour être plus fortes et plus résistantes.

Dose mortelle. — Il faut donc, pour que les pneumocoques injectés donnent chez les chenilles une affection mortelle, que les conditions suivantes soient réalisées : 1° la culture tout récemment renforcée par le passage doit être assez jeune (de vingt à quarante heures); 2° la dose des pneumocoques doit être suffisante (1/80-1/160 de centimètre cube de culture en bouillon).

En prélevant le sang une à deux heures après l'injection des pneumocoques virulents, on constate toujours l'absence de phagocytose. Tous les phagocytes sont vides et n'englobent plus les micro-organismes quoiqu'il y ait une grande quantité de pneumocoques tout à côté, souvent même accolés aux parois des leucocytes.

Quelquefois je pus observer une légère phagocytose dans les premiers moments après l'infection, mais peu après la phagocytose cessa (fig. 4).

Chimiotaxie négative.

Les phagocytes manifestent une chimiotaxie négative très nette envers ces microbes.

Ces faits avaient déjà été signalés pour les animaux supérieurs par Bordet et par Tchistovitch.

Cette réaction négative est surtout démonstrative avec la culture III qui est particulièrement pathogène pour les chenilles.

Il est intéressant que les pneumocoques III qui ne se laissent

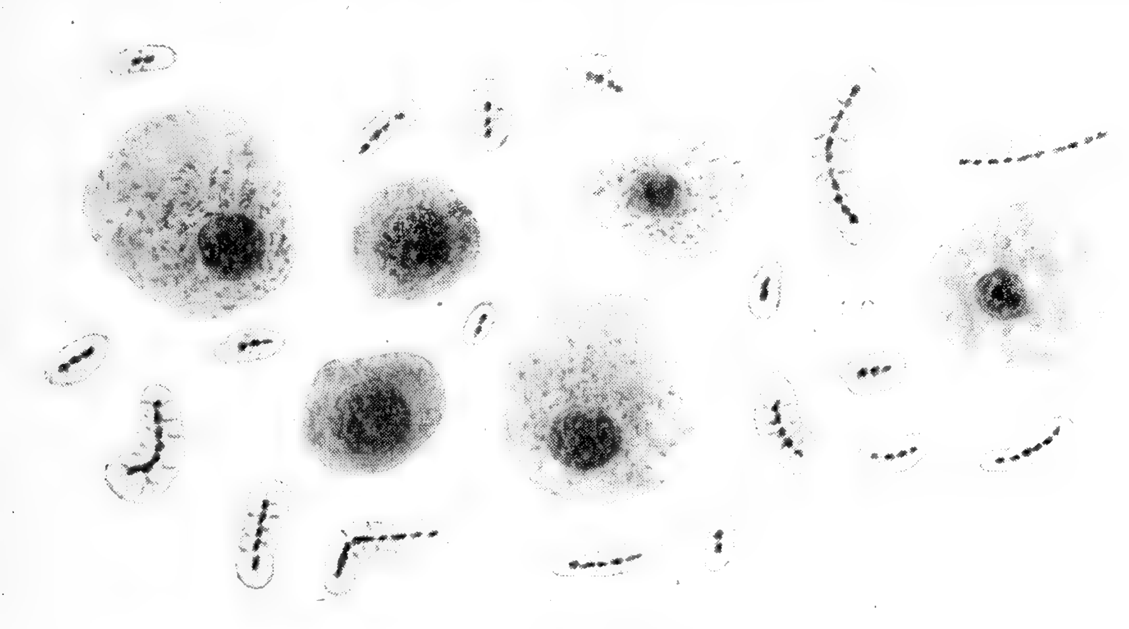


Figure 5.

pas englober par les leucocytes sont munis de grosses capsules, qu'ils ne possédaient pas dans la culture injectée (fig. 5).

Ces capsules sont surtout bien visibles après la fixation des frottis du sang par l'alcool méthylique et la coloration par le thionine phéniqué. Sur les préparations ainsi colorées tout le fond est légèrement coloré en bleu et les microbes sont entourés d'une auréole incolore.

La formation des capsules commence ordinairement une à deux heures après l'infection. Au début, tous les pneumocoques isolés sont entourés de petites auréoles peu marquées. Avec le temps ces auréoles deviennent plus larges et plus visibles. Trois à quatre heures après l'infection et surtout dix à quinze heures après, le sang des chenilles infectées est rempli d'une grande quantité de pneumocoques capsulés. La plupart des pneumocoques forment des chaînettes. Il faut supposer

que les microbes, grâce à ces capsules, ne peuvent pas se séparer et donnent des formes en chaînettes.

C'est seulement les pneumocoques de la race III qui donnent ces formes en capsule et en chaînette.

Jamais je n'ai pu trouver de capsules dans les infections avec les races I et II.

Cependant les cultures jeunes, virulentes, des races I et II, bien que ne formant pas de capsules, ne sont pas non plus englobées par les phagocytes. Ce ne sont donc pas les capsules qui sont la cause de cette chimiotaxie négative.

On a constaté maintes fois que les leucocytes d'un animal très sensible à une espèce microbienne n'englobent pas les microbes virulents de cette espèce, même quand ils sont en contact intime avec eux.

Metchnikoff le premier, en étudiant le charbon chez le cobaye, très sensible à cette affection, a remarqué que la bactéridie n'est pas englobée par les phagocytes quand elle est très virulente.

Depuis, un grand nombre de savants, qui ont travaillé sur la chimiotaxie négative, ont confirmé dans leurs expériences les résultats de Metchnikoff (Gabritchersky, Massart, Bordet, Zilberberg et Zeliony, Tchistovitch).

Mais la cause de la chimiotaxie négative reste encore obscure jusqu'à présent.

Bordet a fait une étude très intéressante sur la phagocytose des streptocoques virulents. En les injectant dans la cavité péritonéale d'un cobaye ou d'un lapin, il a remarqué que les leucocytes n'englobent pas les streptocoques les plus virulents développés dans l'organisme. Il a constaté aussi que les streptocoques virulents sont munis d'une auréole qui prend une teinte violet rose.

« Les leucocytes ne sont pas paralysés, au contraire ils présentent des mouvements en tous sens d'une remarquable activité. Ici intervient un facteur important, la chimiotaxie négative, et nous insistons sur ce point. Cette manière de voir implique que les *phagocytes, guidés par leur sensibilité chimiotactique, peuvent choisir entre les divers microbes avec lesquels ils se trouvent en contact* (1) ».

(1) Bordet. Ces *Annales*, 1896.

Zilberberg et Zeliony, qui ont fait une étude spéciale sur la chimiotaxie négative des leucocytes chez les lapins, arrivent aux mêmes résultats (1). Ils disent : « Il faut expliquer l'absence de phagocytose des bactéries virulentes du choléra des poules, non pas par l'empoisonnement des leucocytes, mais par leur sensibilité chimiotactive négative. Les leucocytes du lapin injecté avec des bactéries du choléra des poules conservent jusqu'à la mort de l'animal non seulement la propriété de choisir entre les bactéries virulentes du choléra des poules et des autres microbes non virulents, mais ils sont capables de distinguer dans une culture virulente les bactéries non virulentes. »

J'ai repris ces expériences sur les chenilles qui présentent un matériel exceptionnel pour l'étude de la phagocytose et de la chimiotaxie négative.

La réaction négative des phagocytes de la chenille envers les pneumocoques virulents ainsi qu'envers d'autres microbes pathogènes est très démonstrative. Mais quelle est la cause de cette chimiotaxie négative? Tient-elle aux capsules qui contiennent peut-être quelque substance toxique pour les phagocytes, ou bien le phagocyte lui-même est-il empoisonné et rendu incapable d'englober les microbes?

Une simple expérience montre que le phagocyte n'est pas empoisonné (comme l'avait déjà démontré Bordet pour les leucocytes du cobaye).

Si on injecte aux chenilles infectées par les pneumocoques virulents un peu de carmin ou d'encre de Chine, on constate, au bout d'un temps très court, que les phagocytes qui refusent énergiquement d'englober les pneumocoques se sont emparés du carmin et de l'encre de Chine. D'autre part, ce n'est pas la toxicité de la capsule et sa dimension qui empêchent la phagocytose.

Nous savons très bien que les phagocytes englobent souvent des substances et des microbes très toxiques. Nous savons aussi que les phagocytes sont capables de modifier leurs réactions envers les microbes. Les phagocytes qui refusent au début d'englober les microbes virulents recommencent à les englober

(1) Ces *Annales*, 1901.

et à les digérer après l'immunisation. Et inversement, nous savons des exemples où les phagocytes, dans les infections mortelles, englobent les microbes aux premiers moments et ne les englobent plus ensuite.

C'est pourquoi nous devons constater le fait que la cellule vivante, le phagocyte, peut changer ses réactions et ses sensations envers les différentes substances, peut choisir, peut acquérir de nouvelles qualités, peut agir d'après ses impulsions internes.

Je dois rappeler ici quelques expériences que j'ai faites jadis sur la digestion intracellulaire des infusoires ciliés (*Paramécies*).

Ces infusoires englobent, comme il est bien connu, du carmin et d'autres substances indigestes. Mais si on leur fait ingérer le carmin pendant longtemps, au bout de quelques jours, elles refusent de continuer à le faire. Elles englobent très bien l'encre de Chine et d'autres couleurs, mais plus le carmin.

Ainsi nous pouvons dire que l'infusoire a acquis une nouvelle qualité, la répugnance envers le carmin qu'il a appris à discerner des autres substances indigestes. Il conservera cette nouvelle qualité pendant toute sa vie individuelle. Après la division il recommence peu à peu à manger le carmin (1).

Ainsi nous voyons bien que l'infusoire modifie ses réactions envers le carmin d'après ses impulsions internes, quoique toutes les conditions externes soient restées les mêmes. N'observons-nous pas quelque chose d'analogue dans la vie des phagocytes?

Immunité passive.

Abordons maintenant l'étude des phénomènes qui se passent dans l'organisme des chenilles injectées préventivement de sérum antipneumococique.

Nous avons essayé les sérums qu'on prépare à l'Institut Pasteur, le sérum II et le sérum III qui correspondent aux races des pneumocoques II et III.

(1) *Archiv. Zool. Expérim.*, **9**, 1911.

EXPÉRIENCES 149. — 5 chenilles reçurent 1/80 c.c. du sérum n° 2 ; 20 minutes après, elles sont injectées par une jeune culture virulente du pneumocoque II (1/40 c.c.) :

Dans 24 heures. . }
— 48 heures. . } Toutes restent vivantes.
— 4 jours . . }

EXPÉRIENCES n° 150 (*contrôle*). — 5 chenilles témoins sont injectées par la même dose de pneumocoques virulents (race II) :

Dans 24 heures, toutes sont mortes.

EXPÉRIENCES n° 151. — 5 chenilles reçurent 1/80 c.c. du sérum III; 20 minutes après, elles sont injectées avec une jeune culture de pneumocoque III (1/40 c.c.) :

Après 24 heures, toutes les chenilles sont vivantes, mais malades;
— 48 heures, 4 mortes, 1 vivante très malade.

EXPÉRIENCES n° 152. — 5 chenilles (témoins) sont injectées par la même dose de pneumocoques virulents (race III) :

Dans les 24 heures, toutes sont mortes.

Nous avons répété plusieurs fois ces expériences qui nous ont démontré que les chenilles qui étaient préventivement injectées par le sérum II guérissent toujours, tandis que les témoins meurent en vingt-quatre heures.

Quant au sérum III, il n'a pas donné des résultats satisfaisants. Les chenilles traitées par ce sérum n'ont sur les témoins qu'une survie de vingt-quatre heures. Il est très facile de suivre pas à pas l'évolution de la maladie chez les chenilles traitées et chez les témoins.

Or, l'infection chez les chenilles témoins est toujours accompagnée d'une pullulation des microbes dans le sang, microbes qui ne sont pas englobés par les phagocytes.

Au contraire, chez les chenilles injectées de sérum, les microbes disparaissent très vite.

Je n'ai jamais pu constater ni agglutination, ni bactériolyse. Une heure après l'infection la quantité de microbes qu'on trouve dans le sang est très restreinte. Il est même parfois difficile de les retrouver sur les préparations. Dans ces conditions le virus est très rapidement englobé par les phagocytes. Mais la plus grande partie est fixée et englobée par les leucocytes agglomérés qui les digèrent très vite.

Chez les témoins qui ont reçu les mêmes doses et qui

n'étaient pas soumis à l'influence protectrice du sérum, on constate souvent aussi la disparition temporaire des microbes, mais deux heures et demie à trois heures après l'infection ils réapparaissent de nouveau en grande quantité et produisent une septicémie mortelle.

*
* *

L'immunité acquise n'a presque pas été étudiée jusqu'à présent chez les insectes. Metchnikoff, avec les larves *d'Oryctes nasicornis*, Mesnil et Kowalewsky, avec les *Scolopendres*, n'ont pu réussir à immuniser ces animaux contre le charbon. Récemment Paillot a montré que les chenilles d'Agrotis (vers gris) pouvaient être facilement immunisées contre le *Bacillus melolonthæ* non liquefaciens qui est très virulent pour elles. D'après les données de Paillot, cette immunité acquise est due exclusivement aux bactériolysines qui se développent dans le sang des chenilles immunisées. Les bacilles se transforment en granules, comme dans le phénomène de Pfeiffer. La phagocytose ne joue aucun rôle quoique les bacilles soient toujours phagocytés, mais ils ne sont pas digérés.

J'ai fait des expériences analogues avec des chenilles de *Galleria mellonella*. L'immunisation est très facile. Il suffit d'injecter à la chenille une petite dose de pneumocoques non virulents ou des pneumocoques chauffés à 58° pour donner, vingt-quatre heures après la vaccination, une immunité très nette envers les doses sûrement mortelles.

En étudiant le sang sur les frottis et les coupes on peut constater que chez les chenilles témoins les microbes pullulent rapidement et donnent une maladie mortelle. Au contraire chez les chenilles immunisées les microbes disparaissent très vite. La plus grande partie des microbes est fixée et englobée par les agglomérations de leucocytes. Cinq à dix heures après l'infection on trouve dans des phagocytes isolés et surtout dans les agglomérations de phagocytes une grande quantité de microbes digérés et transformés en pigment brun-noir.

Dans tous ces cas d'immunité acquise, je n'ai jamais pu constater d'anticorps dans le sang.

Ainsi nous pouvons affirmer que dans tous ces cas d'immu-

nité acquise, étudiés par nous, l'essentiel est le changement dans l'activité et la sensibilité des phagocytes. On peut dire que les cellules, s'adaptant à des conditions nouvelles, changent leurs réactions. Les réactions négatives sont remplacées par des réactions positives. Et dans ces changements de la sensibilité et des réactions de la cellule se trouve la cause principale de l'immunité acquise.

(Laboratoire du professeur Mesnil à l'Institut Pasteur.)

RÉACTION DE FIXATION (ANTIGÈNE DE BESREDKA) ET TUBERCULOSE

par J. RIEUX et Mlle BASS.

(Travail fait au Val-de-Grâce et à l'Institut Pasteur.)

L'application de la réaction de fixation ou de la déviation du complément dans le diagnostic clinique de la tuberculose est à l'ordre du jour. La Société pour l'étude de la tuberculose vient d'y consacrer sa séance du 14 mai 1921. L'avenir dira quelle est sa valeur pratique. Il nous a paru intéressant de donner ici les résultats fournis sur la question par nos recherches personnelles. Ces recherches ont été faites sur un total actuel de 425 malades, passés dans notre service du Val-de-Grâce et presque tous âgés d'une vingtaine d'années. Elles ont été pratiquées avec l'antigène mis obligeamment à notre disposition par M. Besredka, dans son laboratoire de l'Institut Pasteur, et sous son contrôle. Le total de ces travaux est assez élevé pour qu'on soit autorisé à formuler quelques conclusions.

*
* *

Parmi les mémoires parus sur la question (1) nous nous bornerons à signaler l'un des plus importants, celui de Kuss et Rubinstein (1914), qui ont utilisé le même antigène de Besredka. Les recherches de ces auteurs portent sur un nombre assez élevé de cas de tuberculose *avérée*, groupés en cinq classes, selon leur forme et leur allure clinique; seul le groupe I comprenait 7 malades « dont l'histoire clinique avait inspiré des craintes très légitimes sur l'existence d'une tuberculose au début », craintes qui ne furent pas maintenues, et chez lesquels la réaction fut d'ailleurs chaque fois négative.

(1) Voir l'index bibliographique à la fin du mémoire.

Or il est permis de dire que, pour des tuberculeux avérés, la réaction de fixation ne constitue qu'un argument de plus en faveur de la certitude de leur tuberculose, suffisamment établie, par ailleurs, c'est-à-dire par les commémoratifs, l'examen clinique et surtout la bacilloscopie. L'utilité de la réaction intervient seulement dans le cas où le tableau clinique d'une tuberculose pulmonaire est contredit par l'absence de bacilles de Koch dans l'expectoration.

Envisageant à notre tour le problème, il nous a paru intéressant de soumettre à la même étude sérologique des malades *ne présentant aucune certitude de tuberculose, active ou éteinte, mais chez lesquels la tuberculose peut être tout au moins présumée, sous sa forme latente, sur la foi des antécédents, de l'examen clinique et radiographique, la bacilloscopie demeurant négative dans tous les cas.* Clientèle habituelle aux hôpitaux militaires où quotidiennement se pose la difficile question : « Sommes-nous en présence d'une tuberculose latente ou commençante, ou de toute autre chose ? »

*
* *

Nos recherches ont porté, avons-nous dit, sur 425 malades que nous divisons, au nom de la clinique, en 6 groupes :

1° Tuberculose pulmonaire confirmée, de forme clinique diverse avec bacilloscopie positive : 78 cas.

2° Tuberculose péritonéale : 6 cas.

3° Pleurésie séro-fibrineuse, classiquement de nature tuberculeuse, en pleine évolution : 28 cas.

4° Adénopathie trachéo-bronchique représentant le symptôme clinique prédominant : 44 cas.

5° Malades cliniquement présumés tuberculeux, par conséquent suspects de tuberculose latente : 80 cas.

6° Malades n'entrant dans aucune des catégories précédentes, non présumés tuberculeux ou atteints d'une affection n'ayant rien à voir avec la tuberculose.

Malgré le caractère un peu artificiel de cette division, il est facile de comprendre que le premier groupe, celui des tuberculeux avérés et le dernier groupe, celui des non-tuberculeux, constituaient, le premier dans le sens positif, le dernier

dans le sens négatif, un véritable contrôle de la valeur de la réaction, considérée au point de vue un peu spécial où nous nous sommes placés.

La technique suivie a été aussi rigoureusement que possible identique dans tous les cas. Sang recueilli aseptiquement dans la veine du pli du coude le matin entre huit et dix heures; réaction faite le lendemain de la prise de sang. En raison du caractère prépondérant, aujourd'hui bien connu des anticorps syphilitiques sur les anticorps tuberculeux, la réaction de Wassermann a été faite (par les soins de M. Rubinstein) sur le sang de malades chez lesquels la syphilis pouvait être soupçonnée ou chez lesquels la réaction à l'antigène Besredka était, par son caractère positif, en contradiction avec la clinique. Le procédé au sérum chauffé avec addition de doses progressives d'alexine de cobaye a été appliqué à tous les cas et, en raison de son caractère plus rigoureux, a servi de base à l'appréciation du résultat. La méthode directe, au sérum non chauffé, a été utilisée concurremment dans la plupart des recherches et s'est montrée presque toujours en concordance avec la méthode indirecte. Seuls ont été retenus comme tels les résultats nettement positifs. Ajoutons enfin que, chez un grand nombre de malades des trois derniers groupes, la cuti-réaction à la tuberculine a été pratiquée, la prise de sang une fois faite; sur un total de 90 cuti-réactions, nous avons relevé 78 positives, soit 85,5 p. 100 de cas, chiffre habituel au milieu.

Ajoutons enfin que les examens cliniques et les travaux sérologiques ont été faits en complète indépendance les uns des autres, technique nécessaire quand on entreprend de semblables recherches.

*
* *

1° Tuberculose pulmonaire confirmée. — Sur un total de 78 malades, atteints de toutes formes cliniques de la maladie, *une seule fois la réaction a été négative* : homme de trente-deux ans, à la fois syphilitique et tuberculeux, Wassermann et Hecht positifs, tuberculose caséeuse rapidement mortelle. Le pourcentage de réactions de Besredka positives n'est donc pas

loin de 100, ce qui est conforme aux recherches antérieures, de Kuss et Rubinstein en particulier.

Dans deux cas, la bacilloscopie positive a précédé la réaction positive, qui est apparue environ deux mois après le début de la maladie. Dans trois cas, au contraire, la réaction positive a précédé la bacilloscopie positive et a, par conséquent, « annoncé » la tuberculisation virtuelle des poumons.

2° Tuberculose péritonéale. — Sur six observations, la réaction de Besredka a été positive quatre fois, soit 66 p. 100 des cas. Des deux cas négatifs, l'un a succombé à de la méningite tuberculeuse, l'autre a quitté le service dans un état de cachexie profonde. Il est bien établi aujourd'hui que la tuberculose rapide et cachectisante entraîne souvent une réaction négative.

3° Pleurésie séro-fibrineuse. — Nos recherches ont porté sur vingt-huit observations. La réaction de fixation a été, globalement, positive dans seize cas, soit 57 p. 100 des cas. Signalons que deux malades, entrés dans notre service avec une pleurésie séro-fibrineuse et réaction de fixation positive, ont présenté ultérieurement de l'infiltration du sommet correspondant. Ici encore la réaction de fixation a « annoncé » la tuberculose clinique. Il est remarquable, d'ailleurs, que les pleurétiques, à réaction d'emblée positive, possèdent des antécédents héréditaires ou personnels plus ou moins chargés. Signalons enfin que sur cinq malades à réaction négative et sur lesquels ont été pratiquées des réactions en série, trois ont montré une réaction de fixation positive au bout de deux mois à deux mois et demi.

4° Adénopathie trachéo-bronchique. — 44 malades présentant comme symptôme clinique ou radiologique prédominant de l'adénopathie trachéo-bronchique ou médiastinale ont été examinés. 20 fois la réaction de Besredka a été positive : soit 44 p. 100 des cas. Ici encore ce sont les malades à antécédents tuberculeux, héréditaires ou personnels, ou chez lesquels on note quelques signes pulmonaires en plus de leur adénopathie, qui montrent une réaction positive.

*
* *

Si nous groupons tous ces faits de tuberculose clinique, nous arrivons à un total de 156 observations, dont 117 réactions de Besredka positives, soit exactement 75 p. 100. Ce chiffre est assez éloquent par lui-même pour témoigner de la valeur de la réaction de fixation; l'argument est encore meilleur si l'on n'envisage que la tuberculose pulmonaire confirmée, avec 100 p. 100 de réactions positives. On est dès lors autorisé à conclure à la *spécificité* de la réaction de fixation, spécificité affirmée, d'ailleurs, dès 1914, par Küss et Rubinstein. Nous y souscrivons à notre tour, mais avec quelques réserves.

Les sérums normaux donnent une réaction négative. De même celui de malades atteints de rougeole (11 cas), de scarlatine (5 cas), de grippe (7 cas sur 8). Seuls les sérums de syphilitiques, donnant un Wassermann positif, peuvent fournir une réaction positive avec l'antigène de Besredka. Pourtant tous les sérums positifs au point de vue Wassermann ne donnent pas toujours une séro-réaction de tuberculose positive. Au sérum des syphilitiques, nous ajouterons celui des paludéens. Nos recherches ont porté sur 17 cas de paludisme en activité avec hématozoaire, le plus souvent *P. vivax*, dans le sang. Pour tous, les trois réactions (Besredka, Wassermann, Hecht) ont été pratiquées. Dans 6 cas, les trois réactions sont restées négatives. Dans 3 cas, le Besredka a été négatif, le Wassermann et le Hecht étant positifs : on pouvait conclure à la syphilis. Dans 3 cas, le Besredka était positif, le Wassermann et le Hecht étant négatifs; on pouvait conclure à la tuberculose. Enfin, dans 5 cas, les résultats étaient discordants : Besredka et Wassermann positifs, le sérum non chauffé étant dépourvu de propriétés hémolytiques (3 cas); Besredka positif, Hecht positif, Wassermann négatif (1 cas); Besredka et Wassermann négatifs, Hecht positif (1 cas). Ces résultats ont paru sans relation avec la thérapeutique quinique; ils témoignent à notre avis de propriétés fixatrices un peu spéciales à certains sérums de paludéens et liées à la déglobulisation sanguine.

La conclusion générale que nous en avons tirée est que,

tout en étant spécifique, la réaction de fixation à la tuberculose est limitée. Certaines affections, de l'ordre de celles qui modifient profondément les qualités physico-chimiques du plasma sanguin, qui y introduisent des corps colloïdaux nouveaux, des lécithines par exemple, peuvent entraîner une réaction positive, sans que la tuberculose soit en jeu.

Ainsi donc : *limitée*, *néanmoins spécifique*, telle nous apparaît la réaction de fixation avec l'antigène de Besredka. Dans 75 p. 100 de tuberculose clinique de toutes variétés médicales, la réaction est positive, et il est remarquable que ce pourcentage est d'autant plus près de l'absolu que notre certitude de la nature tuberculeuse de la maladie est elle-même plus grande (tuberculose pulmonaire avec bacilloscopie positive). N'est-on pas dès lors, *a priori*, autorisé à s'appuyer sur la même réaction pour attribuer la nature tuberculeuse à tous ces états morbides, qui n'entrent pas dans la tuberculose clinique vraie, mais relèvent de la tuberculose latente, seulement présumée, ou encore de la prétuberculose qui est de la tuberculose commençante?

*
* *

C'est à cette question que se rattache le reste de nos recherches. Mis à part les 41 cas de maladies infectieuses (rougeole, scarlatine, grippe, paludisme) déjà cités, nos examens ont porté sur 228 malades. La réaction de fixation a été positive 68 fois, soit 30 p. 100, et négative 160 fois.

Ces cas sont divisés dans les deux groupements suivants :

1° Malades présumés tuberculeux au nom de la clinique, la bacilloscopie demeurant négative dans tous les cas : 80 cas; 2° malades n'entrant pas dans le groupe précédent : 148 cas.

1° *Malades présumés tuberculeux.* — Sur les 80 malades de ce groupe, 51 ont montré une réaction de fixation positive, soit 63,75 p. 100.

Tous ces malades sont liés par les mêmes traits cliniques, qui autorisent le clinicien à soupçonner la tuberculose, au moins latente : antécédents héréditaires avec cohabitation prolongée; affections pulmonaires diverses de l'enfance ou de l'adolescence, les bronchites fréquentes en particulier; hémo-

ptysie que nous relevons, généralement récente, dans environ la moitié de nos observations; pleurésie séreuse plus ou moins ancienne, ayant laissé la séquelle fréquente des adhérences pleuro-diaphragmatiques décelables à la radioscopie; fièvre légère prolongée avec amaigrissement; adénites chroniques, etc., tous faits pathologiques qu'on trouve dans la majorité des cas de tuberculose réactivée vers la vingtième année.

Si le sérum de tous ces malades ne répond pas positivement à la réaction de Besredka, c'est, à notre avis, pour les raisons suivantes : parce que quelques-uns sont guéris de leur tuberculose ancienne; parce que d'autres ont des séquelles pleuro-pulmonaires qui relèvent de pneumococcies, de streptococcies, de la syphilis, de la grippe; parce que d'autres, enfin, et particulièrement ceux qui dénoncent une tuberculose initiale, sous la forme d'une hémoptysie récente, n'ont pas eu le temps de répandre dans leur sérum des anticorps tuberculeux.

2° *Malades non présumés tuberculeux.* — Ce groupe important comprend des malades de toutes catégories, chez lesquels la notion clinique de la tuberculose n'est pas retenue. Nos recherches ont porté sur 148 malades : 17 fois la réaction a été positive, soit 11,5 p. 100; 131 fois elle fut négative, soit 87,5 p. 100.

Les cas à réaction positive contiennent des faits contradictoires entre la clinique et la réaction de Besredka et qui restent inexpliqués. Mais ils comprennent aussi des faits instructifs et qui confirment la spécificité de la réaction : ainsi deux cas de rhumatisme à début fébrile, puis à allure chronique répondant au type tuberculeux Poncet-Leriche; deux cas de rhinite hypertrophique; un cas d'érythème noueux, dont la relation étiologique avec la tuberculose est admise par certains auteurs, M. Sergent en particulier.

Quant aux 87,5 p. 100 de réactions négatives de ce groupe important, ils appartiennent aux affections les plus diverses. Les unes intéressent l'appareil respiratoire (bronchite aiguë simple ou avec emphysème pulmonaire, pneumococcies, insuffisance respiratoire, etc.); les autres touchent à tous les autres appareils et leur énumération importe peu dans la question. Mais ce fort pourcentage de réactions négatives, certainement inférieur à la réalité, plaide tout autant, par son

caractère négatif, en faveur de la spécificité de la réaction de Besredka, que le pourcentage des réactions positives chez les tuberculeux avérés.

*
* *

De tous ces faits résulte un premier enseignement : c'est l'importance de la réaction de fixation avec l'antigène tuberculeux. Pas plus que pour la réaction de Bordet-Wassermann, nous ne connaissons son processus physico-chimique. Nous dirons seulement que, puisque la réaction de fixation avec le sérum des tuberculeux relève du même processus humoral que la réaction de Bordet-Wassermann, et puisqu'un clinicien ne peut pas ne pas s'incliner devant un Wassermann positif, quand il a des raisons cliniques de le rechercher, la même déduction s'impose avec la séro-réaction de la tuberculose. On peut même dire que la spécificité de la séro-réaction de la tuberculose est plus grande que celle de la syphilis, puisque l'antigène de Besredka est à base de bacilles tuberculeux. Ajoutons enfin que la séro-réaction de la tuberculose se sépare nettement de la cuti-réaction, de l'intradermo-réaction et aussi de l'ophtalmo-réaction. L'étude que nous en avons faite après d'autres aboutit comme elles à la même affirmation.

Quelle signification peut-on attribuer à la séro-réaction de la tuberculose? D'un commun accord, tous les auteurs lui refusent la signification d'une réaction d'immunité, puisqu'on la trouve positive chez presque tous les tuberculeux en activité. On ne saurait dire davantage qu'elle soit une réaction indiquant soit une menace de tuberculisation, soit un réveil d'une tuberculose ancienne, puisqu'on ne la trouve pas dans tous les cas de tuberculose pulmonaire ou pleurale *au début*, non plus que dans tous les cas d'adénopathie trachéo-bronchique. Est-ce une réaction témoignant de la défense de l'organisme contre la tuberculose, défense qui serait aussi intense dans la tuberculose avérée? Jusqu'à mieux informé, et plus généralement, la réaction de fixation positive avec l'antigène de Besredka nous paraît répondre à une infection tuberculeuse existant depuis quelque temps, ou encore, pour reprendre la conclusion de Kuss et Rubinstein : « Elle est un argument

de grande valeur en faveur de l'existence d'une lésion tuberculeuse ayant un certain degré d'activité. »

Mais, telle qu'elle s'offre à nos yeux sur la foi de nos recherches personnelles, elle n'est pas seulement la réaction *témoin* d'une tuberculose *avérée*. D'une manière à la fois plus ample, plus précise, elle nous apparaît comme une réaction *révélatrice* d'une tuberculose *latente*. Autrement dit, pour employer les termes du professeur Calmette, elle ne serait pas seulement la réaction de la tuberculose-maladie, mais, aussi et plus généralement, la réaction de la tuberculose-infection.

CONCLUSIONS

De l'ensemble des faits qui précédent découlent les conclusions suivantes :

1° La réaction de fixation avec l'antigène de Besredka est *spécifique*. Cette spécificité est d'ailleurs reconnue par les auteurs qui ont eu recours à la réaction. Elle n'est mise en défaut qu'avec certains sérums pathologiques, celui des syphilitiques, celui aussi de paludéens (avec hématozoaires dans le sang). Elle ne se manifeste pas dans le cas d'infection tuberculeuse trop récente, non plus que dans certaines formes de tuberculose rapide et cachectisante. Ces restrictions admises, la réaction positive exprime d'une manière générale la tuberculose, la réaction négative la non-tuberculose.

2° Par comparaison avec les autres méthodes de diagnostic scientifique de la tuberculose, d'une part, la réaction à la tuberculine (cuti-, intradermo- et ophtalmo-réactions) et de l'autre, la recherche du bacille de Koch (recherche directe, inoculations, etc.), la réaction de fixation se présente comme intermédiaire : moins étendue, moins banale et plus spécifique que la première ; plus sensible, plus précoce et aussi spécifique que la seconde. Sa portée comme sa valeur dans l'étude de l'évolution tuberculeuse chez l'homme apparaissent dès lors comme plus grandes.

3° Son application clinique et par conséquent sa *valeur diagnostique* découlent de sa spécificité même. Positive, elle se présente comme une base scientifique sur laquelle pourront

s'appuyer les notions cliniques toujours si incertaines de la tuberculose latente ou de la prétuberculose; elle impose à l'esprit du clinicien un examen plus approfondi du malade et de parfaire son diagnostic; elle démontre la nature tuberculeuse de certaines affections qui n'ont pas encore pris place officielle dans le chapitre de la tuberculose. Négative, elle autorise, sous les réserves admises, à écarter la tuberculose.

4° Spécificité et valeur diagnostique font tout au moins entrevoir la portée prophylactique de la réaction de fixation dans la tuberculose. Sur cette formule scientifique, dépister la tuberculose latente avant qu'elle devienne la tuberculose cliniquement confirmée, mettre tout en œuvre pour empêcher la transformation de la première en la seconde, d'une curabilité toujours si difficile, n'est-ce pas le programme vraiment rationnel et logique d'une prophylaxie antituberculeuse, tant individuelle que sociale?

BIBLIOGRAPHIE

WIDAL et LESOURD. *C. R. Soc. méd. Hôp.*, Paris, 5 juillet 1901, p. 786.

A. CALMETTE, MASSOL et BRETON. *C. R. Soc. de Biol.*, 1908.

A. CALMETTE. *C. R. Soc. de Biol.*, 1911, **71**, p. 342.

R. LETULLE, Réactions humorales dans la tuberculose. *Thèse de Paris*, 1912.

ARMAND-DELILLE, RIST et VAUCHER. *C. R. Soc. de Biol.*, 19 avril 1913.

BESREDKA. Ces *Annales*, novembre 1913.

BESREDKA et MANOUKHINE. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **76**, p. 180.

BESREDKA et JUPILLE. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **76**, p. 197.

DEBAINS et JUPILLE. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **76**, p. 199.

INMAN. *C. R. Soc. de Biol.*, 1914, **76**, p. 251.

BRONFENBRENNER. *Zeit. f. Immun.*, 1915, **25**, p. 231.

BESREDKA. *Paris médical*, 1914-1915, p. 219.

KÜSS et RUBINSTEIN. *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 19 juin 1914, p. 153.

BOEZ et DUHOT. *C. R. Soc. de Biol.*, mai 1919, p. 559.

BRETON et DUHOT. *Bull. Institut Pasteur*, n° 23, 1919, p. 753.

A. CALMETTE, *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux*, Paris, 1921, p. 478 et suiv.

RUBINSTEIN, *Traité pratique de sérologie et de sérodiagnostic*, Paris, 1921, p. 297 et suiv.

A. BASS, Sérodiagnostic de la tuberculose au moyen de l'antigène de Besredka. *C. R. Soc. de Biol.*, 16 octobre 1920, **143**, p. 1261.

CH. HRUSKA et W. PFENNINGER. Ces *Annales*, janvier 1921, p. 96.

RÉACTION DE FIXATION A L'ANTIGÈNE DE BESREDKA DANS LA TUBERCULOSE EXTERNE

par B. FRIED et M. MOSER.

(Travail fait à l'Institut Pasteur et à l'Hôpital maritime de Berck-sur-Mer.)

Les premières recherches expérimentales sur la réaction de fixation au moyen de l'antigène tuberculeux à l'œuf (1) effectuées par Besredka ont établi (2) que, chez les animaux de laboratoire, la réaction apparaît d'une façon très précoce : chez les cobayes, dès le quatrième jour, chez les lapins vers le quinzième ou vingtième jour. La réaction précède donc de longtemps les altérations viscérales visibles à l'examen microscopique.

Au cours de ces recherches, Besredka a cru observer que la réaction de fixation marchait jusqu'à un certain degré de pair avec la résistance de l'animal. Ainsi, chez le cobaye tuberculeux, la réaction de fixation de positive devient négative dans les jours qui précèdent la mort. Chez le lapin inoculé avec les bacilles humains, auxquels généralement il résiste fort bien, la réaction est durable et intense. En d'autres termes, la réaction est d'autant plus accusée que l'animal se défend mieux contre l'infection.

De nombreuses recherches effectuées depuis avec le même antigène ont démontré que les constatations faites par Besredka sur les animaux de laboratoire se vérifient chez l'homme et chez les bovidés.

Ainsi Bronfenbrenner (3), de Harvard medical School à Boston, L. Raychman, de London King's College, Inman (4), de Brompton Hospital de Londres, qui avaient examiné chacun

(1) Ces *Annales*, 1913, p. 1009.
(2) *C. R. Soc. de Biol* , **26**, p. 180 et **76**, p. 197.
(3) *Arch. int. méd.*, 1914, n° 6, p. 789 et *Zeitschr. f. Immun.*, 1914, **23**.
(4) *C. R. Soc. de Biol.*, **76**, p. 251 et *The Lancet*, 23 mai 1914.

des centaines de sérums de tuberculeux et de non-tuberculeux, conclurent de leurs recherches que, chez les tuberculeux, la réaction de fixation est précoce et spécifique.

D'après ces auteurs, la réaction négative, chez les tuberculeux, indique soit l'absence d'une lésion tuberculeuse, soit l'arrêt d'une lésion active; une réaction positive indique, d'après eux, une lésion tuberculeuse en activité. Debains et Jupille (1) [570 cas] sont arrivés aux mêmes conclusions.

Küss et Rubinstein (2) qui se sont servis, comme les auteurs précédents, de l'antigène à l'œuf, conclurent, en se basant sur une étude approfondie de 100 malades, que la réaction de Besredka « est surtout utile dans les cas où on est hésitant pour le diagnostic d'une tuberculose pulmonaire; une séro-réaction négative ne permet pas de rejeter le diagnostic de la tuberculose; mais une séroréaction positive est un argument de grande valeur en faveur de l'existence d'une lésion tuberculeuse ayant une certaine activité ».

Les travaux récents de Rieux et Bass (3) sur un nombre considérable de tuberculeux et non-tuberculeux; ceux d'Ichok sur les vieillards, confirment les observations antérieures.

Les recherches de Fried (4) portant sur plus de 200 malades, contrôlés par l'examen bactériologique et radioscopique, amenèrent cet auteur à conclure que dans la réaction de fixation au moyen de l'antigène de Besredka on possède une des méthodes les plus sûres de diagnostic de la tuberculose; que cette réaction permet de dépister celle-ci à la période initiale, pendant que la clinique est encore muette.

Rappelons, enfin, les recherches parues récemment de Hruska et Pfenninger (5) d'où il résulte que la proportion des résultats positifs chez les bovidés tuberculeux est de 84 à 95 p. 100, suivant la localisation des lésions. D'après ces auteurs, la réaction de fixation, au moyen de l'antigène de Besredka, est appelée à rendre un service signalé dans la lutte contre la tuberculose bovine.

(1) *Soc. de Biol.*, **21**, p. 199.
(2) *Bull. de la Soc. méd. des Hôp.*, 12 juin 1914.
(3) *Rev. de la tuberculose*, n° 1, 1921.
(4) *Rev. de la tuberculose*, n° 6, 1920.
(5) Ces *Annales*, n° 1, 1921.

Si, dans la tuberculose viscérale, les recherches faites de différents côtés ne laissent plus subsister aujourd'hui aucun doute sur la valeur de la réaction, dans la tuberculose externe, au contraire, cette réaction ne paraît pas avoir acquis la place qu'elle mérite cependant, comme nous allons le montrer.

Il est, en effet, admis que, dans la tuberculose externe, le sang ne subit point les mêmes modifications que dans la tuberculose viscérale. Ainsi, dans son livre qui fait autorité en la matière, Calmette (1) s'exprime ainsi à ce sujet : « Les sérums des sujets atteints de tuberculose chirurgicale ne renferment aucune trace d'anticorps, lorsque ces malades ne présentent aucun stigmate de tuberculose ganglionaire ou pulmonaire. »

TECHNIQUE

Dans tous les cas examinés, la réaction a été faite concurremment par la méthode au sérum chauffé, ainsi que par le procédé au sérum non chauffé, dit rapide (système hémolytique : lapin anti-mouton et système hémolytique : lapin anti-humain). Le sang des malades a été prélevé par ponction veineuse, le plus souvent, au pli du coude, quelquefois à la veine jugulaire. L'examen du sérum était toujours pratiqué dans les vingt-quatre heures qui suivaient la prise du sang.

Comme antigène, nous nous sommes servis de l'antigène à l'œuf de Besredka.

Les réactifs nécessaires à la réaction : sérum, antigène, eau physiologique, etc., étaient distribués en tubes à hémolyse, à l'aide de pipettes compte-gouttes de calibre uniforme (15 gouttes par centimètre cube). La réaction finale portait sur 10 gouttes. Ce dispositif économise beaucoup de temps et ne nuit en rien à la précision de la réaction.

Dans la méthode au sérum chauffé, nous avons adopté le procédé préconisé par Calmette et Massol : doses constantes d'antigène et de sérum à examiner, doses croissantes d'alexine.

Dans une épreuve préalable, l'alexine était titrée en présence d'antigène et de sérum normal; la dose minima d'alexine ayant déterminé l'hémolyse (ordinairement 2 gouttes à 1/5 ou 1 goutte à 1 : 8) était employée comme dose initiale dans la réaction.

	GOUTTES							
Sérum chauffé	2	2	2	2	2	2	2	2
Antigène. . . .	3	3	3	3	0	0	0	0
Alexine	1 à 1:8	1 à 1:6	1 à 1:5	1 à 1:4	1 à 1:8	1 à 1:6	1 à 1:5	1 à 1:4
Eau physiol.. .	2	2	2	2	5	5	5	5

Une heure à 37°.

(1) L'infection bacillaire et la tuberculose, Masson, 1920, p. 507.

	GOUTTES							
Hématies de mouton à 1:20	1	1	1	1	1	1	1	1
Sérum hémolytique.	1	1	1	1	1	1	1	1

La lecture des résultats est faite une demi-heure après la sortie des tubes de l'étuve.

Dans le procédé au sérum non chauffé, nous employons la technique qui est couramment employée dans le laboratoire de M. Besredka.

Rappelons que dans cette méthode on utilise l'alexine du sérum examiné et son hémolysine vis-à-vis des globules de mouton. Pour être concluante, la réaction doit être précédée d'une étude du pouvoir hémolytique du sérum vis-à-vis des hématies de mouton, c'est-à-dire du dosage de l'indice hémolytique du sérum à examiner.

Exemple de détermination de l'indice hémolytique :

	GOUTTES				
Sérum frais	1	1	1	1	1
Hématies de mouton à 1 : 20	1	2	3	4	5
Eau physiol. pour compléter à 10 gouttes.	8	7	6	5	4

La lecture, faite après une demi-heure à 37°, donne l'indice hémolytique et la dose de globules de mouton à employer dans la réaction.

Supposons, par exemple, que le sérum étudié produise en une demi-heure une hémolyse totale dans les trois premiers tubes, une hémolyse partielle dans le quatrième, une hémolyse nulle dans le cinquième; nous dirons que son index hémolytique est égal à 3; le nombre des gouttes employées dans la réaction sera donc 3 gouttes.

Pour un tel sérum, la réaction sera disposée comme suit :

	GOUTTES		
Sérum frais	1	1	1
Antigène.	1	2	3
Eau physiologique (pour un volume total de 10 gr.).	5	4	3
	Une heure à 37°.		
Globules de mouton à 1 : 20.	3	3	3

Après une demi-heure d'étuve, on lit les résultats.

Cette méthode a été appliquée pour la première fois par M. Pellier (1) dans le séro-diagnostic de la tuberculose (antigène de Besredka). Fried (2), en collaboration avec Goldenberg, a examiné 153 sérums par les deux procédés; les deux méthodes ont donné des résultats concordants.

Dans le procédé au sérum non chauffé (système hémolytique : lapin-globules humains), nous nous sommes inspirés de très près de la technique préconisée par Ronchèse pour le séro-diagnostic de la syphilis (3); cette méthode

(1) *Thèse de Montpellier*, 1920.
(2) *C. R. de Biol.*, 6 novembre 1920.
(3) La réaction de Bordet-Wassermann, 1919 (Masson et Cie).

utilise l'alexine du sérum humain et fait intervenir dans le complexe hémolytique la sensibilisatrice antihumaine.

Les difficultés signalées par les différents auteurs pour l'obtention d'un bon sérum de lapin anti-humain proviennent le plus souvent du lavage incomplet des hématies.

Il est, en effet, facile d'obtenir un sérum hémolytique anti-humain d'un titre variant de 1/40 à 1/60, c'est-à-dire, un sérum dont une goutte diluée au 1/40-1/60 hémolyse, en une demi-heure à 37°, une goutte de globules humains (1/8), en présence d'une goutte de sérum de cobaye (au 1/3), dans un volume total de 10 gouttes.

Quelle que soit la voie par laquellle on injecte les globules (veine ou péritoine), ceux-ci doivent être soigneusement lavés et débarrassés des moindres traces de sérum.

Ces injections sont pratiquées à quatre jours d'intervalle. Huit jours après la dernière injection, l'animal est saigné et le sérum est titré.

Par suite de la variabilité du taux en alexine propre à chaque sérum, il est nécessaire de déterminer exactement, dans un essai préliminaire, la quantité de sensibilisatrice à employer pour chaque sérum à examiner.

Supposons qu'une goutte de sérum hémolytique antihumain (1/30) hémolyse une goutte de globules humains (à 1/8) en présence de deux gouttes d'un mélange de sérums humains (pour avoir un sérum de titre moyen, on mélange plusieurs sérums humains). Dans l'essai préliminaire, l'expérience est disposée comme suit :

	GOUTTES				
Sérum frais.	1	1	1	1	1
Sensibilisatrice.	2	2	2	2	2
Globules humains à 1 : 8.	1 à 1 : 34	1 à 1 : 32	1 à 1 : 30	1 à 1 : 28	1 à 1 : 26
Eau physiologique. . .	6	6	6	6	6

30 minutes à 37°.

Le tube qui, avec le minimum de sensibilisatrice, détermine l'hémolyse en une demi-heure indique la dilution de sensibilisatrice à employer dans la réaction.

Le dispositif suivant permet de faire les deux épreuves en même temps sans que ni le titrage, ni la réaction en souffrent.

Dans les trois premiers tubes destinés à la séro-réaction de la tuberculose, on verse deux gouttes de sérum, des doses variables (de 1 à 3 gouttes) d'antigène, de l'eau physiologique, de façon à ramener le volume total à 10 gouttes.

Le quatrième tube (témoin) contient 2 gouttes de sérum et 6 gouttes d'eau physiologique. Dans la même rangée, on dispose cinq autres tubes destinés au titrage préliminaire : chacun des tubes reçoit 2 gouttes de sérum humain et 6 gouttes d'eau physiologique.

Après un séjour d'une demi-heure à 37°, on ajoute aux cinq tubes destinés au titrage préliminaire de la sensibilisatrice et des globules humains (à 1/8). La sensibilisatrice est ajoutée à raison d'une goutte des dilutions allant de 1/34 à 1/26 (dans l'exemple choisi).

Après un nouveau séjour d'une demi-heure à l'étuve, on voit à quel taux la sensibilisatrice doit être employée dans la réaction.

Nous pratiquons par le même procédé et simultanément la séroréaction de la syphilis pour chaque sérum.

A cet effet nous versons, dans trois tubes, deux gouttes de sérum et des doses progressivement croissantes d'antigène syphilitique (1, 2, 3 gouttes d'antigène de Noguchi). Cette recherche simultanée (tuberculose et syphilis) est indispensable, une certaine proportion de sérums syphilitiques fixant l'alexine en présence de l'antigène tuberculeux.

DOCUMENTS CLINIQUES

Nous avons examiné, par les trois procédés qui viennent d'être décrits, 869 malades de l'hôpital maritime de Berck-sur-Mer. Leur âge variait de 2 à14 ans. Leur état général ne laissait rien à désirer dans la plupart des cas : aucune lésion viscérale n'a pu être constatée chez eux, sauf de bien rares exceptions.

Ces malades se répartissent comme suit :

Maux de Pott	196 cas.
Coxalgies	143 —
Tumeurs blanches du genou	116 —
Lésions ostéo-articulaires (coude, poignet, épaules, cou-de-pied, etc)	158 —
Tuberculose externe multiple (plus de deux foyers)	56 —
Adénites	44 —
En outre :	
Syphilis osseuses et ganglionnaires	24 —
Affections ostéo-articulaires non tuberculeuses	32 —
Rachitiques cliniquement non tuberculeux	100 —
Total	869 cas.

	p. 100 de réactions positives —
Les maux de Pott, dont le début remonte à moins d'un an, nous ont fourni un pourcentage de	68,3
De 1 an à 2 ans	78,6
De 2 à 3 ans	61,0
Au delà de 3 ans	37,5

	p. 100 des cas —
Chez les pottiques fistuleux, avec état général grave, la réaction n'a été positive que dans	10,5

	p. 100 de réactions positives
	—
La tuberculose coxale dont le début remonte à moins d'un an	63,0
De 1 an à 2 ans	67,3
De 2 ans à 3 ans	50,0
Au delà de 3 ans, le pourcentage tombe à	16,0
Dans la coxalgie fistuleuse, il est de	34,0
Dans la *tumeur blanche du genou* remontant à moins d'un an, la réaction donne	67,4
De 1 an à 2 ans	69,0
De 2 ans à 3 ans	55,4
Au-dessus de 3 ans	21,4
Dans le genou fistuleux	16,0
Dans les autres lésions ostéo-articulaires tuberculeuses, celles qui remontent à moins d'un an ont donné	65,4
De 1 an à 2 ans	60,6
De 2 ans à 3 ans	15,0

	p. 100 de résultats positifs
	—
Les malades porteurs d'adénites :	
Les lésions datant de moins d'un an ont fourni	48
— de 1 ans à 2 ans	39
— au-dessus de 2 ans	13,3

	p. 100 de réactions positives
	—
Tuberculoses multiples :	
Les lésions multiples de petites articulations ont donné	56,6
Les locations multiples de grosses articulations (genou, hanches, vertèbres)	50

	p. 100 de résultats positifs
	—
Les rachitiques (100 sérums), sans manifestations tuberculeuses cliniquement appréciables, ont donné	9,8
Ceux à cuti-réaction négative (64 malades)	4,8
Ceux à cuti-réaction positive (36 malades)	15

Notons qu'un de nos petits rachitiques qui a présenté, au mois de décembre 1920, une réaction de fixation positive, alors

que cliniquement rien ne la justifiait, présenta au mois de janvier 1921 un abcès de la jambe qui, d'après la radiographie, fut en rapport avec un foyer tuberculeux juxtagonal du tibia.

Trente-deux personnes atteintes de lésions ostéo-articulaires, cliniquement non tuberculeuses, ont fourni un résultat positif dans 6.25 p. 100.

CONCLUSIONS

Contrairement à l'opinion généralement admise, on observe dans la tuberculose externe les mêmes modifications du sang que dans la tuberculose viscérale ; elles se traduisent par l'apparition d'anticorps spécifiques, décelables par la réaction de fixation, en présence de l'antigène de Besredka.

Une réaction de fixation positive autorise, sauf de rares exceptions, à conclure à l'existence d'un foyer tuberculeux *en activité*; la réaction négative ne permet pas de rejeter le diagnostic de tuberculose.

La proportion des réactions positives, très élevée au stade initial, *évolutif* de la tuberculose externe, baisse notablement à l'époque de la cicatrisation des lésions.

LES ORGANES A SÉCRÉTION INTERNE DANS LA GANGRÈNE GAZEUSE EXPÉRIMENTALE

par Paul VAN GEHUCHTEN.

(Travail du laboratoire de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur).

De nombreux travaux d'histologie pathologique ont été consacrés à l'étude des modifications des glandes à sécrétion interne au cours des maladies infectieuses ou des intoxications. Peu d'auteurs cependant ont tenté de faire un travail d'ensemble pour une infection déterminée et d'étudier simultanément les réactions des différents organes contre le germe pathogène. C'est là ce que nous avons entrepris dans une infection aiguë que la guerre a remise en pleine actualité : la gangrène gazeuse.

Nous nous sommes borné dans ce travail à l'étude de la surrénale, de l'hypophyse et de la thyroïde, car il semble bien que, parmi les organes à sécrétion interne, ce soient ceux dont l'atteinte ait une répercussion notable sur l'évolution d'une infection. Nous nous sommes étendu plus longuement sur les lésions de la surrénale, parce que cette glande présente des modifications très caractéristiques qui peuvent aider à comprendre son fonctionnement à l'état normal et dans les états pathologiques.

M. Weinberg, en nous proposant de faire ces recherches dans son laboratoire, a attiré tout spécialement notre attention sur l'intérêt qu'il y aurait à préciser l'état de la fonction adrénalogène surrénale dans les infections anaérobiques. Peut-être serait-il possible, en effet, de renforcer le traitement sérothérapique de la gangrène gazeuse dans les cas très graves et à intervention très tardive par l'addition d'adrénaline au sérum. On pourrait de cette façon suppléer temporairement à une insuffisance médullaire.

HISTORIQUE

Avant d'exposer les résultats de nos recherches expérimentales, nous allons rappeler brièvement quelles sont les lésions ou les modifications fonctionnelles qui ont été décrites dans les organes à sécrétion interne :

1° Dans les infections et les intoxications ;

2° Dans la gangrène gazeuse.

1. — *Infections et intoxications diverses.*

A. — **Médullaire surrénale.**

Charrin et Langlois (1893-1896), Wybauw (1897), dans des cas d'infection aiguë par bacilles pyocyaniques ou diphtériques chez le cobaye, ont constaté une forte hyperémie de la surrénale et des petits foyers d'hémorragies au niveau de toutes les couches glandulaires. L'extrait de ces organes hyperémiés n'a plus qu'une action hypertensive beaucoup moindre qu'à l'état normal.

Reichtmann (1902), dans la diphtérie, la scarlatine, la fièvre typhoïde, la rougeole chez l'homme, trouve les mêmes lésions hémorragiques.

Lucksch (1905-1909), après intoxication par le phosphore, après infection diphtérique, colibacillaire, tuberculeuse, staphylococcique chez le lapin, constate la perte ou la diminution de l'action hypertensive de l'extrait surrénal. Il conclut à la diminution de la sécrétion adrénalinique.

Pirone (1911), dans des cas de rage humaine, trouve une infiltration cellulaire intense (lymphocytes, gros mononucléaires, cellules plasmatiques). Les cellules chromaffines sont désagrégées et ont le plus souvent perdu leur caractère chromatique.

Porak (1919), au contraire, ne constate pas de variation dans la sécrétion d'adrénaline après intoxication rabique chez le lapin, après tétanos et diphtérie des cobayes et des lapins, poliomyélite du singe, broncho-pneumonie, fièvre typhoïde chez l'homme, intoxication par le mercure, le plomb, la strychnine chez le cobaye. Dans les cas chroniques, il y a diminution de l'action hypertensive; mais cette diminution n'est que relative, l'adrénaline étant cherchée dans un extrait total d'une glande à corticale hypertrophiée.

B. — **Corticale surrénale.**

Bernard et Bigard (1902-1906), dans l'intoxication par l'arsenic et le mercure chez le cobaye, décrivent des lésions vasculaires allant de la congestion aux hémorragies en foyer. L'intoxication massive (mort en quarante-huit heures) montre une augmentation des graisses osmophiles, une diminution de l'aspect vacuolaire de la spongieuse, la disparition du pigment de la réticulée. L'intoxication atténuée non mortelle se traduit après un à trois jours par une hypertrophie de la spongieuse, une diminution du pigment. L'intoxication lente (plusieurs mois) montre des altérations cellulaires profondes de la spongieuse (les cellules sont atrophiées, ratatinées) et une augmentation du pigment.

Bogomolez (1905-1910), dans la diphtérie expérimentale chez le chat; Bedson

(1913), dans l'intoxication vermineuse aiguë, signalent des lésions hémorragiques et la disparition de l'aspect vacuolaire de la spongieuse par excrétion des lipoïdes. Il existe souvent dans cette couche de nombreuses figures de division.

Dans l'intoxication vermineuse chronique chez le cobaye qui réagit bien, Bedson a trouvé la spongieuse notablement hypertrophiée.

Elliot et Tuckett (1906) décrivent dans la surrénale du cobaye des graisses, une substance biréfringente et du pigment brun. Dans la diphtérie, alors que la substance biréfringente et le pigment diminuent, les graisses augmentent.

Weltmann (1913) signale une diminution notable des substances biréfringentes dans la surrénale de l'homme qui a succombé à une infection aiguë (septicémie, fièvre typhoïde, entérite, péritonite, pneumonie croupale). Elles augmentent dans l'artériosclérose, la cirrhose du foie, la néphrite chronique. Les infections expérimentales chez le cobaye lui montrent une diminution comparable de cette substance biréfringente. Les recherches de Aschoff, de Weltmann ont montré que cette substance biréfringente était l'éther de la cholestérine.

Dietrich (1918), dans la péritonite aiguë chez l'homme, trouve une augmentation des lipoïdes après douze heures, une diminution après dix-huit heures. Après trois à neuf jours, de grandes cellules qui ont probablement un rôle compensateur, apparaissent dans la fasciculée.

C. — **Corps thyroïde.**

Roger et Garnier ont étudié les lésions du corps thyroïde dans la plupart des maladies infectieuses; Bedson les a étudiées dans l'intoxication vermineuse; Simonds dans les infections septicémiques. La congestion est variable. Il y a parfois des hémorragies. Les vésicules ont souvent un épithélium desquamé. Certaines n'ont plus de colloïde, mais on retrouve dans les vaisseaux lymphatiques du tissu interstitiel une masse considérable de colloïde (Roger).

Dans les cas chroniques, la réaction interstitielle aboutit à la sclérose de l'organe.

D. — **Hypophyse.**

Pirone (1911), dans la rage chez l'homme, décrit une infiltration cellulaire intense et une diminution des cellules éosinophiles, lorsque l'infection a une évolution lente. Dans les cas de mort rapide, il a trouvé une hyperactivité fonctionnelle de la glande (amitose, nombreuses cellules éosinophiles).

Bedson, dans l'intoxication vermineuse, ne trouve de lésions que dans un cas sur quatre. De nombreuses cellules sont en dégénérescence. L'ectasie vasculaire est légère.

2. — *Gangrène gazeuse.*

Dietrich (1918), dans la gangrène gazeuse chez l'homme, a trouvé une congestion vasculaire intense, de nombreux foyers hémorragiques et de l'infiltration leucocytaire dans la médullaire et la corticale. Dans la corticale, il y a diminution considérable des lipoïdes, dégénérescence cellulaire et formation de cavités glandulaires.

Dans la médullaire, les lésions sont moindres, la réaction chromaffine est conservée.

Goormachtigh (1918), dans la gangrène gazeuse chez l'homme, signale des transformations profondes.

Pour lui, à l'état normal, la zone spongieuse ne contient que de la graisse labile (lipoïdes), la zone fasciculée de la graisse indélébile (graisses neutres). Cette dernière zone est sécrétrice. Telle était aussi l'opinion de Bernard et Bigard. Au niveau de la fasciculée s'élaborent les graisses indélébiles qui vont passer dans la spongieuse et devenir labiles.

Après une gangrène gazeuse foudroyante (vingt-quatre heures), le lipoïde de la spongieuse devient indélébile; dans la gangrène gazeuse de trente-six à cent heures, la zone spongieuse disparaît. Elle fait place à une zone excrétrice superficielle où les lipoïdes indélébiles passent dans les lumières glandulaires formées par les dégénérescences cellulaires. La zone fasciculée reste une zone sécrétrice. Vers la soixantième heure, elle s'atrophie, mais alors la glomérulée se transforme et va relever la fasciculée dans son rôle.

Dans les cas à évolution lente (huit jours), de nouveaux îlots spongieux labiles apparaissent, mais ils dépendent cette fois de la glomérulée où se trouvent en grand nombre des graisses indélébiles.

Dans les cas chroniques, la glande est remaniée, la glomérulée s'étend. Elle contient de nombreuses graisses indélébiles (graisses neutres) qui aboutissent à des îlots de graisse labile (lipoïdes).

Dans la moelle les éléments chromaffines prédominent. Il ne peut donc être question d'insuffisance adrénalinique. L'hypersécrétion est la règle.

Il y a peu de lésions pathologiques : quelques foyers hémorragiques et des amas leucocytaires. Dans deux cas sur sept, les lésions sont profondes et ont pu provoquer de l'insuffisance surrénale.

Nous résumons dans le tableau suivant les modifications des inclusions cellulaires de la corticale surrénale telles qu'elles ont été décrites par les différents auteurs dans les infections et les intoxications.

	SUBSTANCES GRASSES en général	CHOLESTÉRINE	GRAISSES NEUTRES	PIGMENT
Intoxication par arsenic et mercure (1902) . .	—	Diminution.	Augmentation.	Disparition.
Intoxication vermineuse (1913).	Diminution.	—	—	—
Diphtérie (1906).	—	Diminution.	Augmentation.	Diminution.
Septicémie (1913)	—	Id.	—	—
F. typhoïde (1913)	—	Id.	—	—
Péritonite (1913)	—	Id.	—	—
Pneumonie (1913)	—	Id.	—	—
Gangrène gazeuse (1918) (Goormachtigh). . .	—	Id.	Augmentation?	—
Gangrène gazeuse (1918) (Dietrich)	—	Id.	—	—

RECHERCHES PERSONNELLES

Nos recherches ont porté sur soixante-cinq cobayes. Ces animaux utilisés par M. Weinberg pour d'autres expériences ont été injectés, les uns avec des cultures pures de microbes anaérobies, les autres avec des mélanges de cultures d'anaérobies ou de cultures d'aérobies et d'anaérobies.

Voici comment ils se répartissent :

I.	— Gangrène gazeuse à *B. Perfringens*	25 cas.
II.	— Gangrène gazeuse à *V. septique*	10 cas.
III.	— Gangrène gazeuse à *B. Œdematiens*	2 cas.
IV.	— Gangrène gazeuse à *B. Histolyticus*	4 cas.
V.	— Gangrène gazeuse putride (*Perfringens* + *Sporogenes*)	10 cas.
VI.	— Association *Perfringens* + *Proteus*	5 cas.
VII.	— Association *Sporogènes* + *Proteus*	5 cas.
VIII.	— Association *Histolyticus* + *Proteus*	1 cas.
IX.	— Association *Oedematiens* + *Proteus*	1 cas.
X.	— Association *V. septique* + *Proteus*	1 cas.
XI.	— Infection par *Proteus* seul.	1 cas.

TECHNIQUE

L'autopsie des animaux a toujours été pratiquée immédiatement après leur mort, et les pièces fixées dans le formol à 10 p. 100 ou dans le liquide de Bouin pour l'étude histologique générale, dans le liquide de Muller ou d'Erlicki pour la recherche de la réaction chromaffine de la médullaire surrénale, dans le liquide de Meves (pendant huit jours) pour la mise en évidence des graisses de la corticale surrénale. Les coupes de fragments inclus dans la paraffine ont été colorées par l'hématoxyline au fer et l'hématéine-éosine. Les coupes par congélation, après fixation au formol ou au Bouin, nous ont permis d'utiliser les divers procédés de coloration des graisses (Soudan III, Nil, coloration directe par l'acide osmique) et les recherches des corps biréfringents en lumière polarisée entre Nicols croisés.

Nous croyons indispensable, avant d'entrer dans le détail de nos expériences, de donner un court aperçu des données récentes sur la structure

histologique de la corticale surrénale du cobaye, d'énumérer les différentes inclusions cellulaires que l'on y a décrites et les moyens histochimiques qui nous ont permis de les mettre en évidence.

Corticale surrénale du cobaye. — A l'état normal, on peut y distinguer quatre couches (Guieysse). La *glomérulée* entoure complètement la glande. Elle est formée de culs-de-sac de cylindres corticaux qui, arrivant à la capsule fibreuse, s'incurvent sur eux-mêmes et forment des follicules (Guieysse). Cette couche n'a guère qu'un à deux follicules d'épaisseur. Elle est formée de petites cellules à gros noyaux, présentant assez souvent des figures de divisions indirectes (Mulon) (1). Elle serait l'origine de toutes les autres couches (Mulon, Bogomolez).

La *spongieuse* représente environ le quart de l'écorce chez le cobaye adulte; les deux tiers chez le cobaye jeune. Elle est formée de grosses cellules polygonales bourrées d'enclaves graisseuses. Guieysse les a appelées des spongiocytes.

La *fasciculée* continue insensiblement la spongieuse en dedans. Elle est formée de cellules à protoplasme dense. L'hématoxyline au fer y décèle des granulations colorées en noir qui sont de nature pigmentaire (Mulon). Quelques cellules sont vacuolaires et affectent un type de transition entre la spongieuse et la fasciculée. Chez la femelle, cette zone de transition est très développée et constituée d'amas de grosses vacuoles graisseuses.

La *réticulée* a des cellules assez semblables. Les corps sidérophiles s'y retrouvent sous forme de petites gouttes très nombreuses. De nombreuses cellules sont transformées en blocs pigmentaires. D'autres sont en dégénérescence. Leur noyau est petit, ratatiné. Parfois, les cellules l'expulsent; d'autres fois, il se dissout dans le protoplasme et la cellule se désagrège.

Inclusions cellulaires. — On peut mettre en évidence dans la corticale surrénale du cobaye deux variétés de corps gras : les *graisses neutres* et les *lipoïdes*.

Les *graisses neutres* sont des éthers triacides de la glycérine. On admet, généralement que ces graisses réduisent l'acide osmique et prennent une teinte noire dans la solution osmiée. Mulon a montré que cette propriété n'appartient qu'à l'acide oléique et que seules prenaient une teinte noire les graisses contenant une proportion notable d'oléine. Les autres prennent une teinte bistre, qui ne devient noire que par le passage à l'alcool. Les graisses de la surrénale rentrent dans ce dernier groupe. L'acide osmique leur donne une teinte bistre qui noircit par passage à l'alcool. Il faut donc les considérer comme des graisses pauvres en oléine. Il existe cependant dans les couches les plus externes de la fasciculée quelques inclusions graisseuses qui réduisent directement l'acide osmique. Ce sont ces graisses que Bernard et Bigard appelaient indélébiles; ce sont celles que Goormachtigh décrit sous le même nom.

Les graisses neutres se colorent en rouge par le Soudan, en rouge par le bleu de Nil. Elles sont isotropes, c'est-à-dire ne présentent pas le phénomène de la biréfringence en lumière polarisée.

(1) Nous remercions vivement M. Mulon des précieux renseignements qu'il nous a donnés au sujet de la corticale surrénale du cobaye et de l'extrême obligeance avec laquelle il a bien voulu examiner quelques-unes de nos préparations.

Les *lipoïdes* forment un groupe complexe. Lambling les classe en lipoïdes phosphorés, dont les mieux connus sont les lécithines; et en lipoïdes non phosphorés, où se place la cholestérine. La cholestérine accompagne, en général, la lécithine, on la trouve libre ou combinée à l'état d'éther avec les acides gras. Parmi les lipoïdes de la surrénale, l'éther de cholestérine occupe une place prépondérante (Aschoff, Weltmann).

L'*éther de cholestérine* se colore en gris par l'acide osmique, mais noircit

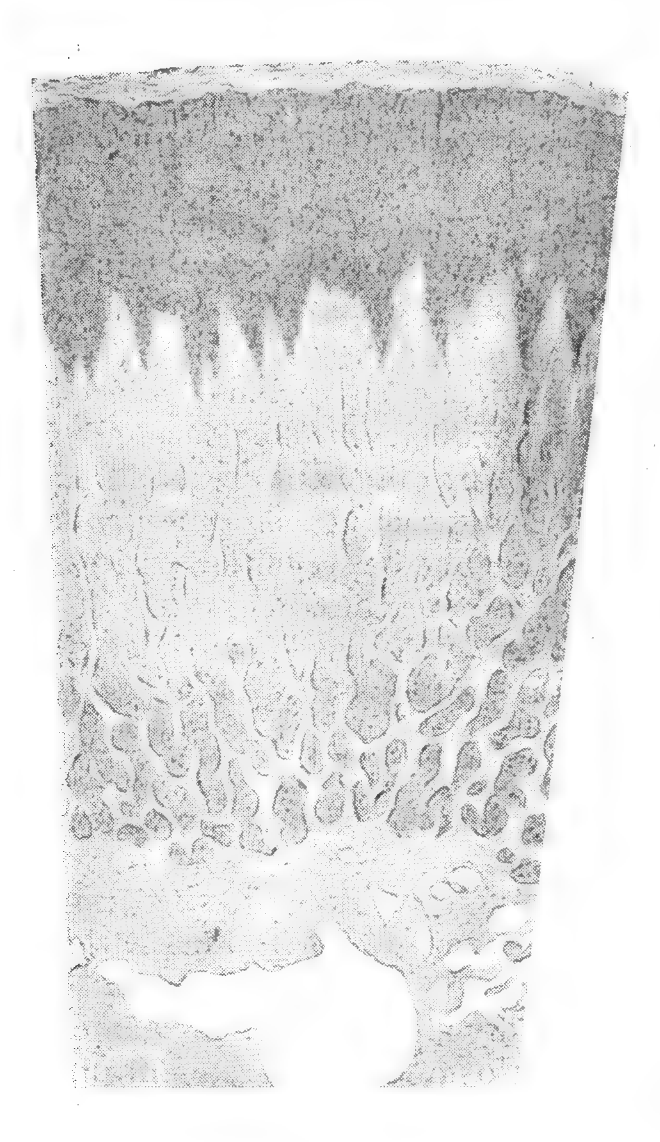


FIGURE 1. FIGURE 1 *bis*.

FIG. 1. — Cobaye normal. Coupe par congélation sans coloration. Obj. 3, oc. 2.

FIG. 1 *bis*. — Cobaye normal. Même préparation vue en lumière polarisée. *a*) zone spongieuse bourrée de corps biréfringents (cholestérine); *b*) zones fasciculée et réticulée; *c*) médullaire.

secondairement dans l'alcool. Il se colore en rouge orange par le Soudan, en rose par le Nil. Ses réactions colorantes sont donc très voisines de celles de la graisse. Mais en lumière polarisée, l'éther de cholestérine est biréfringent, ce qui permet de le mettre en évidence avec certitude.

RÉPARTITION. — L'*éther de cholestérine* ne se trouve à l'état normal que dans la spongieuse. Chez la femelle, il occupe également une partie notable de la zone des grandes vacuoles de la fasciculée. Il est partout intimement mêlé aux graisses (fig. 1 et 1 *bis*).

Les *graisses* se trouvent dans la spongieuse avec la cholestérine. On les

trouve également, mais en quantité moindre et sous forme de très fines gouttelettes, dans la glomérulée et la partie externe de la fasciculée (fig. 2).

Le *pigment* occupe les couches maigres (réticulée et partie interne de la fasciculée). Il est très visible sous forme de granulations brunes sur des coupes non colorées faites par congélation. Il occupe presque toutes les cellules. Parfois il prend un tel développement que les cellules ne sont plus qu'un bloc pigmentaire. Une partie de ces granulations pigmentaires est



Fig. 2. — Cobaye normal. Zone spongieuse bourrée de graisse colorée en noir par l'acide osmique. Fixé au Meves. Obj. Stiassnie 3, oc. 2.

sidérophile. La zone pigmentaire est beaucoup plus étendue chez le cobaye adulte que chez le cobaye jeune (Mulon).

Nous avons tenté de mettre en évidence les *acides gras libres* de la corticale, mais nous n'avons obtenu que des résultats inconstants.

I — Gangrène gazeuse à *B. perfringens*.

Cobayes injectés avec une culture pure de *B. perfringens* ou avec une toxine obtenue par centrifugation d'une culture de douze à seize heures en bouillon glucosé à 1 pour 1.000.

1° *Surrénale.*

A. — Animaux morts en deux a trois heures.

C 19 (deux heures). La congestion est très intense dans toute la corticale, surtout dans la réticulée et la zone intermédiaire

entre la spongieuse et la fasciculée. De nombreux foyers d'hémorragie dissocient les couches cellulaires.

La médullaire paraît intacte.

C 6 (une demi-heure). Il y a très peu de congestion et pas de lésions apparentes.

B. — Animaux morts en cinq a dix heures.

Cobayes : C 11 (cinq heures), C 9 (dix heures), C 40 (dix heures).

1° Morphologie. — Coloration hématoxyline-éosine. *Faible grossissement.* Objectif Stiassnie 4. Ocul. 4).

Les *lésions hémorragiques* sont peu profondes ; dans toutes les couches les capillaires sont dilatés. Il y a quelques petits foyers d'hémorragie dans la spongieuse en C. 11. En C. 40, ces foyers sont plus nombreux.

L'aspect général de la corticale a peu changé.

La *glomérulée* est nettement visible avec ses trois ou quatre assises de petites cellules foncées à noyau très colorable.

La *spongieuse* est bien conservée, mais sa disposition est moins régulière qu'à l'état normal. Le protoplasme est plus colorable, les vacuoles ont toutes les dimensions, certaines sont très grosses. Quelques cellules foncées ont presque complètement perdu l'aspect vacuolaire. Les capillaires renferment de nombreuses gouttes de graisse. Les variations individuelles sont assez considérables. C'est ainsi qu'en C 11 (cobaye mort après cinq heures), les grosses vacuoles sont beaucoup plus nombreuses et la sortie des graisses plus active qu'en C 9 (cobaye mort après dix heures).

La *fasciculée* proprement dite continue la spongieuse. En C 9 de nombreuses cellules de la fasciculée sont en dégénérescence ; leur noyau est petit, ratatiné et refoulé à la périphérie du protoplasme.

La *réticulée* a un aspect très semblable. Il y a de nombreuses cellules en dégénérescence dans tous les cas. En C 11, les blocs sidérophiles sont très nombreux ; ils le sont beaucoup moins en C 9 et en C 40.

Fort grossissement. — Objectif immersion homogène 1/16 Demardelez. Oc. 4.

Il précise quelques détails.

Dans la *glomérulée* en C 11, il y a de nombreuses figures de division directe et indirecte. En C 9 et en C 40, on trouve des noyaux à encoche et des noyaux doubles, tels que Mulon les a décrits dans les cas de division directe.

Les grosses vacuoles observées dans la *spongieuse* sont le plus souvent à proximité des capillaires. Elles y font saillie et parfois paraissent s'y ouvrir.

Dans les cellules en dégénérescence, on voit souvent autour du noyau une vacuole claire. Leur protoplasme montre des plaques de nécrose qui semblent nager dans du liquide. La plupart des cellules de la *fasciculée* et surtout de la *réticulée* ont de fines granulations sidérophiles (pigment). Ces granulations sont originaires du noyau et passent en grand nombre dans les capillaires.

La *médullaire* présente un aspect variable. En C 9, il y a une véritable

fonte cellulaire; de nombreux noyaux se réduisent en granulations chromatiques, le protoplasme se dissout en granulations éosinophiles. L'aspect est semblable, mais moins accusé dans les autres capsules. Partout la rétraction protoplasmique est intense. Dans les espaces clairs, on trouve des débris cellulaires et des lymphocytes.

2° Graisses et lipoides. a) *Soudan III*. — La zone graisseuse occupe la moitié de la corticale. Les gouttelettes ont une coloration rouge orangé. La glomérulée en contient très peu, la spongieuse en est remplie, la fasciculée

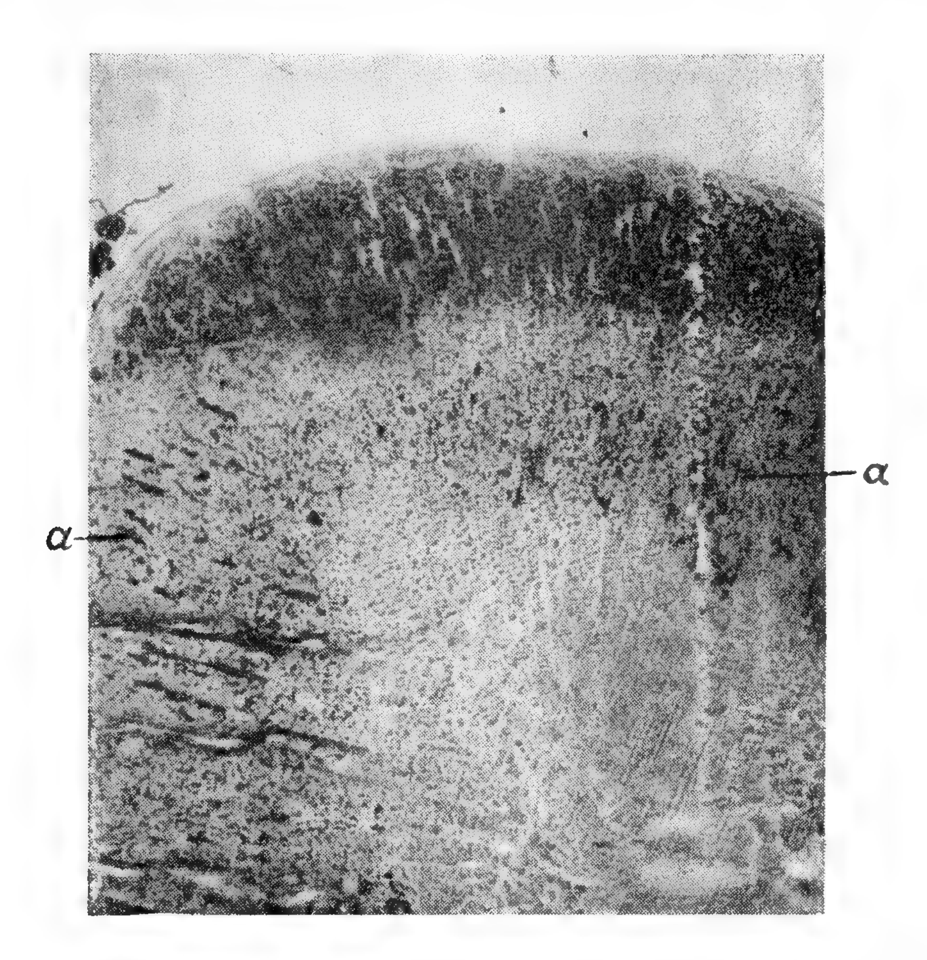


Fig. 3. — Cobaye 11 (cinq heures). Même technique. Capillaires bourrés de graisses (a).

en contient une assez grande quantité (cobayes femelles), la réticulée n'en a pas. Les capillaires ont de nombreuses gouttelettes rouges.

b) *Acide osmique* (avec réduction secondaire).

Il y a sortie abondante des substances grasses. Elles sont notablement diminuées dans la spongieuse, surtout à certaines places ; mais les capillaires sont bourrés de gros amas noirs, parfois arrondis, et qui contiennent souvent des vacuoles claires. D'autres cellules encore remplies montrent de grosses gouttes rangées marginalement (fig. 3).

3° Ether de cholestérine (lumière polarisée). — L'aspect est encore très voisin de celui d'une capsule normale. Les corps biréfringents (gouttelettes à croix de polarisation) sont nombreux et occupent la spongieuse et la zone externe de la fasciculée.

4° Pigments (Examen des coupes fraîches). — Ils sont peu nombreux en C 9 et C 10, plus nombreux en C 11. Les cellules de la réticulée ont une légère teinte brunâtre et, entre les cellules, on trouve des blocs pigmentaires jaunâtres. Ces cobayes sont des animaux jeunes.

5° Réaction chromaffine médullaire. — Elle est encore intense, bien que moindre qu'à l'état normal. Certaines cellules sont pâles, d'autres sont déjà totalement décolorées.

En résumé, à ce premier stade, les lésions hémorragiques

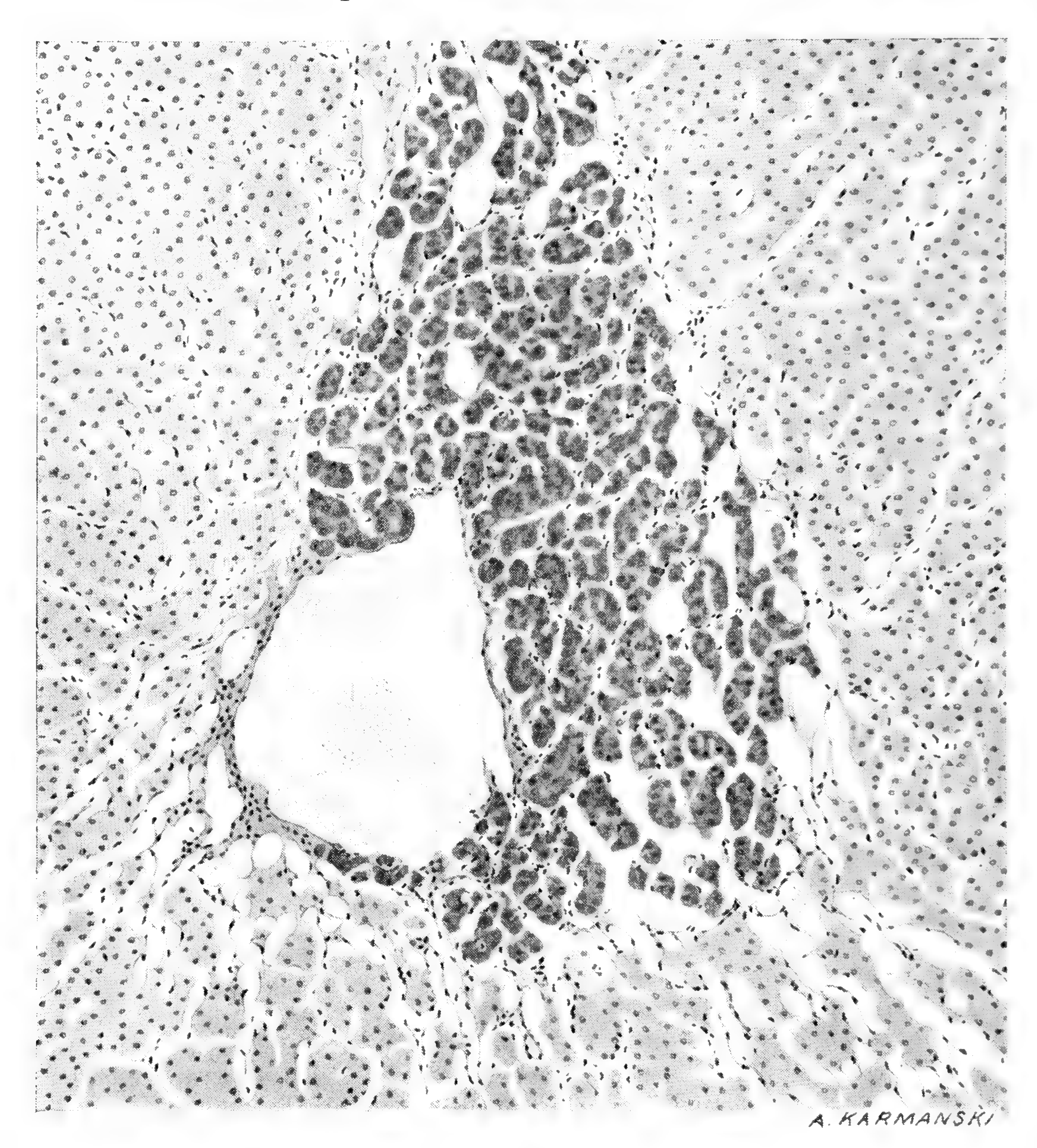


Fig. 4. — Médullaire normale. Réaction chromaffine. Gross. 80/1.

sont peu profondes, les dégénérescences cellulaires sont plus intenses qu'à l'état normal au niveau des couches maigres (fasciculée et réticulée) et de la médullaire. La réaction cellulaire se traduit par des mitoses au niveau de la glomérulée. D'une part, il y a *sortie abondante des substances grasses de la spongieuse* ; d'autre part, *décharge pigmentaire* au niveau de la réticulée. *La réaction chromaffine médullaire est diminuée.*

C. — Animaux morts en dix a cinquante heures.

Cobayes : C 21 (dix-neuf heures), C 15, C 16 (vingt heures), C 2 (vingt-quatre heures), C 8 (vingt-six heures), C 22 (vingt-

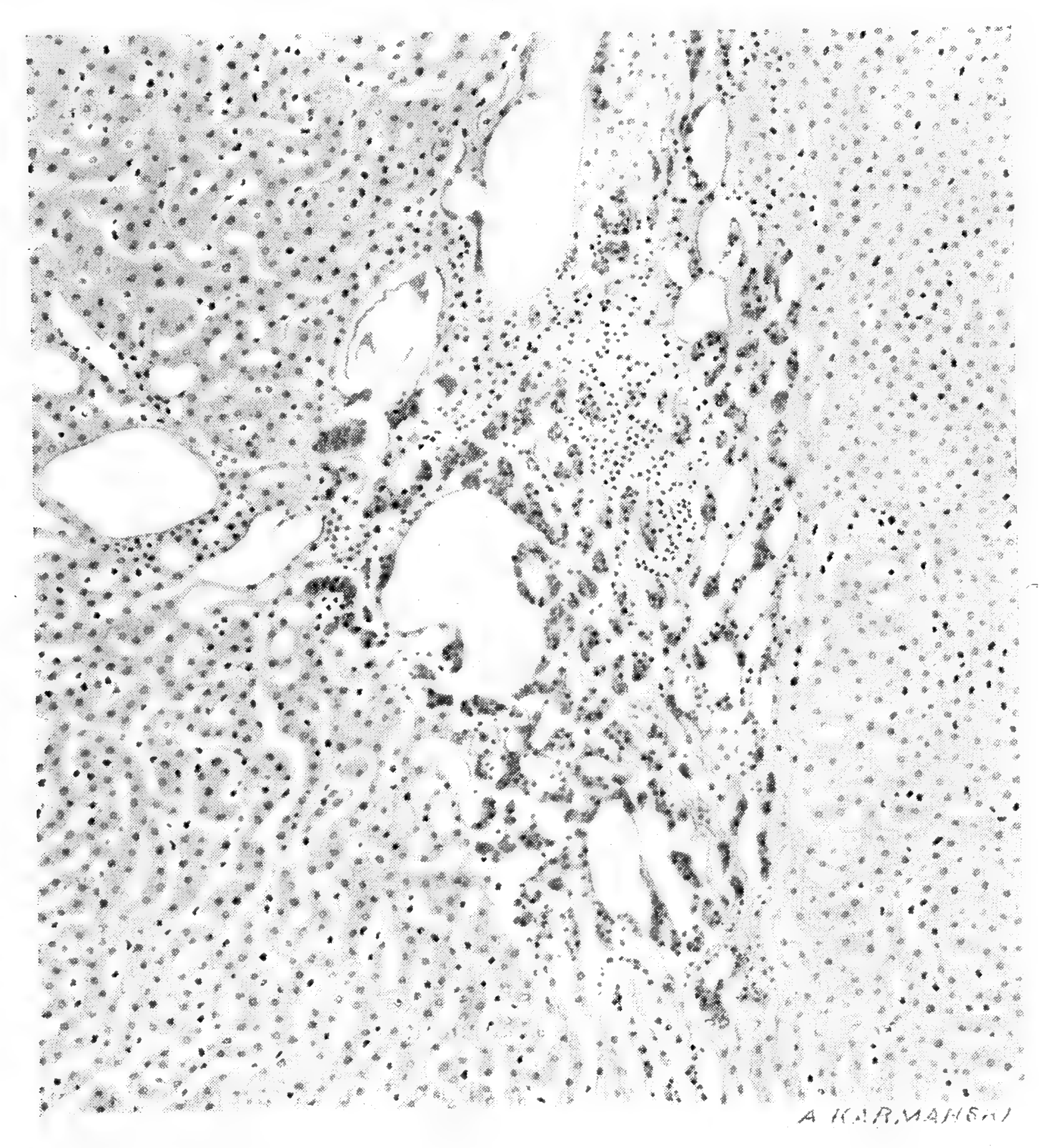


Fig. 5. — Cobaye 25. Médullaire. Forte diminution de la réaction chromaffine. Rétractions cellulaires. Quelques amas leucocytaires. Gross. 80/1.

sept heures), C 36 (trente-six heures), C 24 et C 25 (quarante-cinq heures).

1° Morphologie. Coloration hématoxyline-éosine. *Faible grossissement.* — Les lésions hémorragiques sont variables mais toujours intenses. Dans un cas (C 8), il y a rupture de la veine centrale et hémorragie médullaire. Dans tous les cas, il y a une très forte congestion corticale, surtout marquée au niveau de la partie interne de la spongieuse et externe de la fasciculée. Il y a souvent rupture vasculaire et les tissus sont par places dissociés par l'infiltration sanguine.

L'aspect général de la corticale s'est notablement modifié, mais les variations individuelles sont assez considérables.

La *glomérulée* est bien distincte. Par places, elle pénètre dans la spongieuse et se continue insensiblement avec elle.

La *spongieuse* est profondément modifiée. L'aspect vacuolaire régulier de la corticale normale a disparu. Certaines cellules ont de grosses vacuoles, d'autres ont un protoplasme presque uniforme.

En C 8, l'aspect est un peu spécial. Toute la corticale est en voie d'atrophie. Cette atrophie est peut-être la conséquence de la très forte hémorragie centrale.

Dans les autres cas, les couches tendent à s'uniformiser; l'aspect de la spongieuse se rapproche de celui de la fasciculée.

Les gros blocs pigmentaires de la *réticulée*, nombreux en C 8, sont peu nombreux dans les autres capsules.

Fort grossissement. — Dans la *glomérulée*, il y a quelques figures de division directe et indirecte.

Dans la *spongieuse* on trouve tous les types de transition entre les cellules vacuolaires normales et les cellules à protoplasme granuleux sans vacuole. Dans les capillaires, il y a d'assez nombreuses gouttes de graisse. La dégénérescence cellulaire ne semble pas plus accentuée qu'à l'état normal sauf en C 8.

Les granulations sidérophiles sont moins nombreuses dans les couches internes qu'à l'état normal.

(C 15, 16, 21, 22 sont des animaux adultes.)

Dans la médullaire de nombreuses cellules ont un protoplasme rétracté, mais leur noyau est d'aspect normal. Quelques cellules sont en dégénérescence. Il y a quelques amas de lymphocytes.

2° Graisses et lipoides. a) *Soudan III.* — Diminution considérable des substances grasses. La glomérulée en contient en petite quantité; les assises cellulaires voisines de la spongieuse en contiennent une assez grande quantité; mais dans tout le restant de la couche, la diminution est très marquée. Les capillaires contiennent beaucoup de graisses. Dans la fasciculée et la réticulée, d'assez nombreuses cellules ont des gouttelettes rougeâtres.

b) *Acide osmique.* — L'aspect est identique. Il semble que la glomérulée contienne plus de graisse qu'à l'état normal.

3° Ether de cholestérine. — Il y a diminution énorme de la substance biréfringente. On en trouve encore dans la spongieuse juxta-glomérulaire et par places dans le restant de cette même couche.

4° Pigments. — Le pigment a considérablement diminué, sauf en C 8. La diminution porte surtout sur le pigment intracellulaire.

5° Réaction chromaffine. — Elle est beaucoup moins intense qu'à l'état normal. De nombreuses cellules sont décolorées (fig. 4, 5 et 6). Les cordons cellulaires sont beaucoup plus grêles qu'à l'état normal.

En résumé, à ce stade, les lésions hémorragiques sont assez intenses, la dégénérescence cellulaire ne paraît pas plus marquée, la réaction cellulaire se traduit par quelques figures de division directe et indirecte dans la zone glomérulaire et juxtaglomérulaire. La décharge des substances grasses (graisses neutres

et cholestérine) est très intense. Ces substances se retrouvent en quantité notable dans les capillaires ; mais *les graisses neutres font leur apparition dans la zone maigre* (couches réticulée et fasciculée) *et augmentent dans la glomérulée*. Le pigment de la réticulée a notablement diminué. La réaction

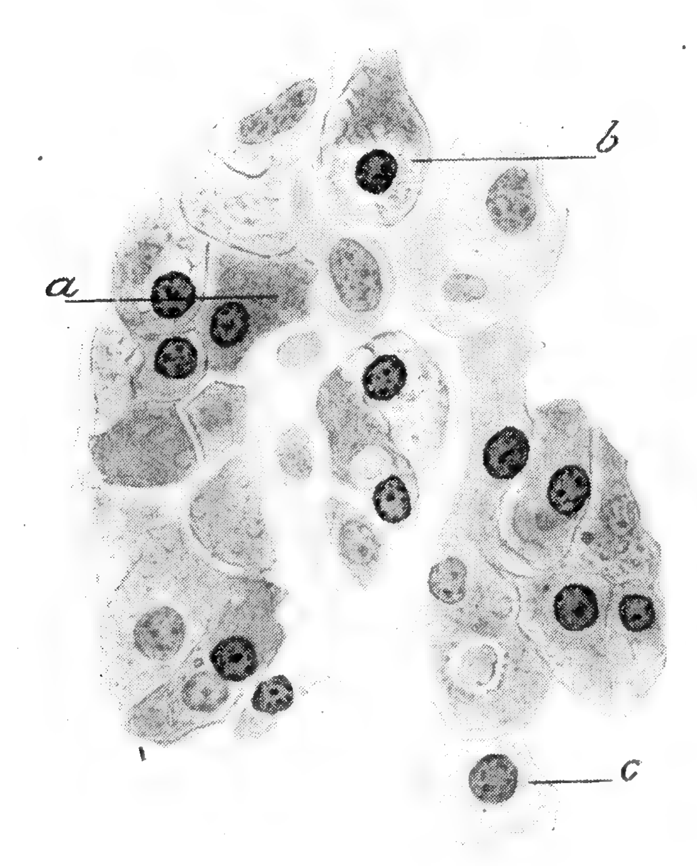


Fig. 6. — Cobaye 25. Fort grossissement : *a*) cellule chromaffine ; *b*) cellule partiellement décolorée ; *c*) cellule décolorée. Gross. 650/1.

chromaffine médullaire est très affaiblie, ce qui traduit *un appauvrissement de la surrénale en adrénaline.*

D. — Animaux morts en plus de cinquante heures.

Cobayes : C 12 (cinquante-deux heures), C 17 (cinquante-huit heures), C 30 (quatre-vingts heures), C 28 (quatre-vingt-seize heures), C 13 (cent heures), C 32 (cent soixante-dix heures).

1° Morphologie. Hématoxyline-éosine. *Faible grossissement.* — Les lésions hémorragiques sont moins accusées qu'au stade précédent. En C 12 et C 17, la congestion est intense dans la zone corticale moyenne. Dans les autres cas, la corticale est intacte, la moelle est assez congestionnée.

En C 28, C 13, la glomérulée et la spongieuse se continuent l'une l'autre, presque sans marque de démarcation. La partie externe de cette zone est vacuolaire, la partie interne qui correspond à une notable partie de l'ancienne spongieuse est uniforme. Au contraire, l'ancienne fasciculée et la plus grande partie de la réticulée sont nettement vacuolaires. De nombreuses cellules ont même l'aspect de spongiocytes.

Fort grossissement. — Toute la couche externe renferme de très nombreuses figures de division. Au contraire, la zone interne montre de très nombreuses cellules en dégénérescence. Les blocs et les granulations sidérophiles sont très peu nombreux dans la réticulée. Médullaire : on observe souvent de la rétraction protoplasmique, de la congestion et de l'infiltration leucocytaire. Dans certaines capsules, il y a des dégénérescences cellulaires.

2° GRAISSES ET LIPOIDES. a) *Soudan.* — La zone spongieuse est presque *privée* de graisse, sauf dans sa portion externe juxta-glomérulaire. La glomérulée

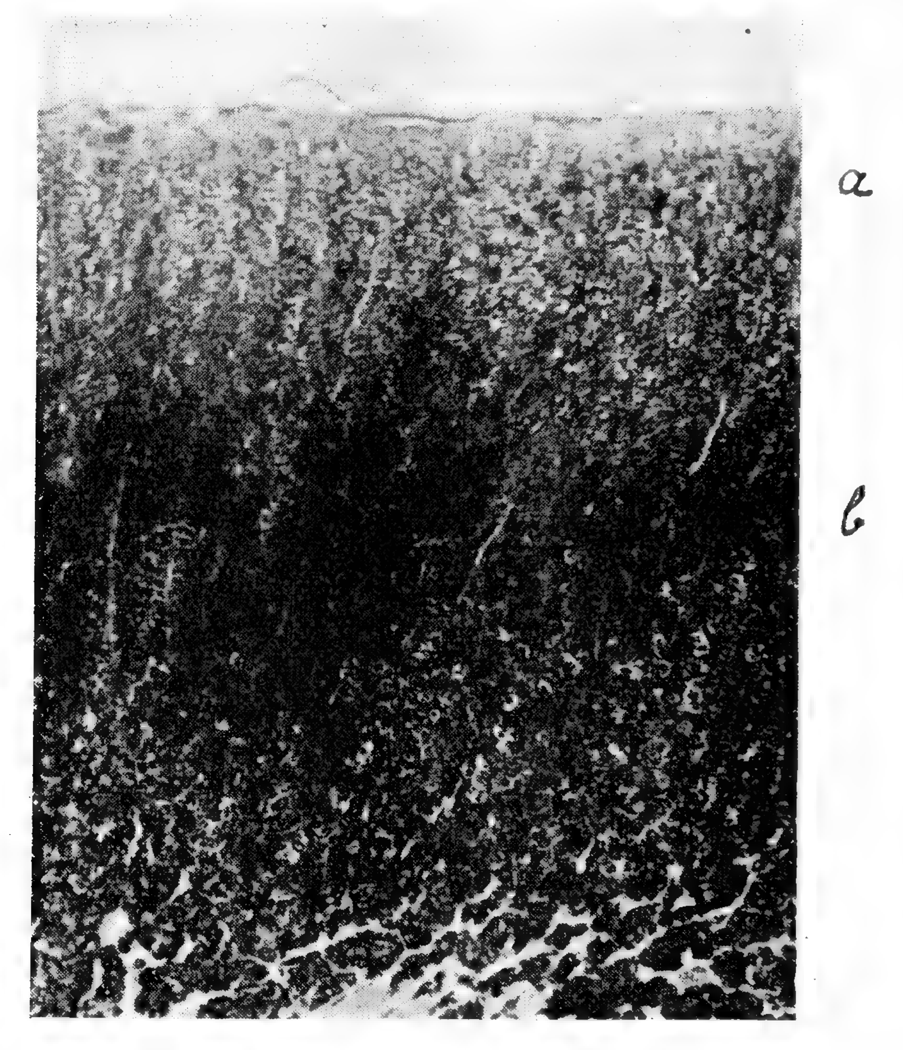


FIG. 7. — Cobaye 13 (cent heures). Même technique : *a*) zone spongieuse sans graisse; *b*) zones fasciculée et réticulée remplies de graisses.

en contient en quantité considérable, de même que la fasciculée et la réticulée.

b) *Acide osmique.* — La disposition est identique (fig. 7). On trouve de la graisse dans les capillaires au niveau de la zone grasse externe et dans la zone grasse médiane.

3° CHOLESTÉRINE. — En C 12, il persiste de très rares corps biréfringents dans la spongieuse. En C 30, tout a disparu. En C 28, C. 13, C. 32, la spongieuse n'en contient plus. Mais en C 28, il en apparaît une quantité assez considérable dans la nouvelle zone grasse; en C 13, il en apparaît dans cette zone et en très faible quantité au niveau de la glomérulée (fig. 8 et 8 *bis*), en C 32 en quantité plus considérable au niveau de la glomérulée.

4° PIGMENTS. — En C 28 et C 32, il en persiste quelques blocs. En C 13, ils ont totalement disparu. C 13 est un cobaye adulte.

5° Réaction chromaffine. — Elle est assez bien conservée en C 30. Elle est, au contraire, très faible en C 28.

En résumé, à ce stade les lésions hémorragiques sont moins marquées, la dégénérescence cellulaire est très avancée dans les couches internes, mais la réaction cellulaire est d'une intensité égale dans l'*ancienne* spongieuse.

Les graisses neutres ont presque disparu de la spongieuse,

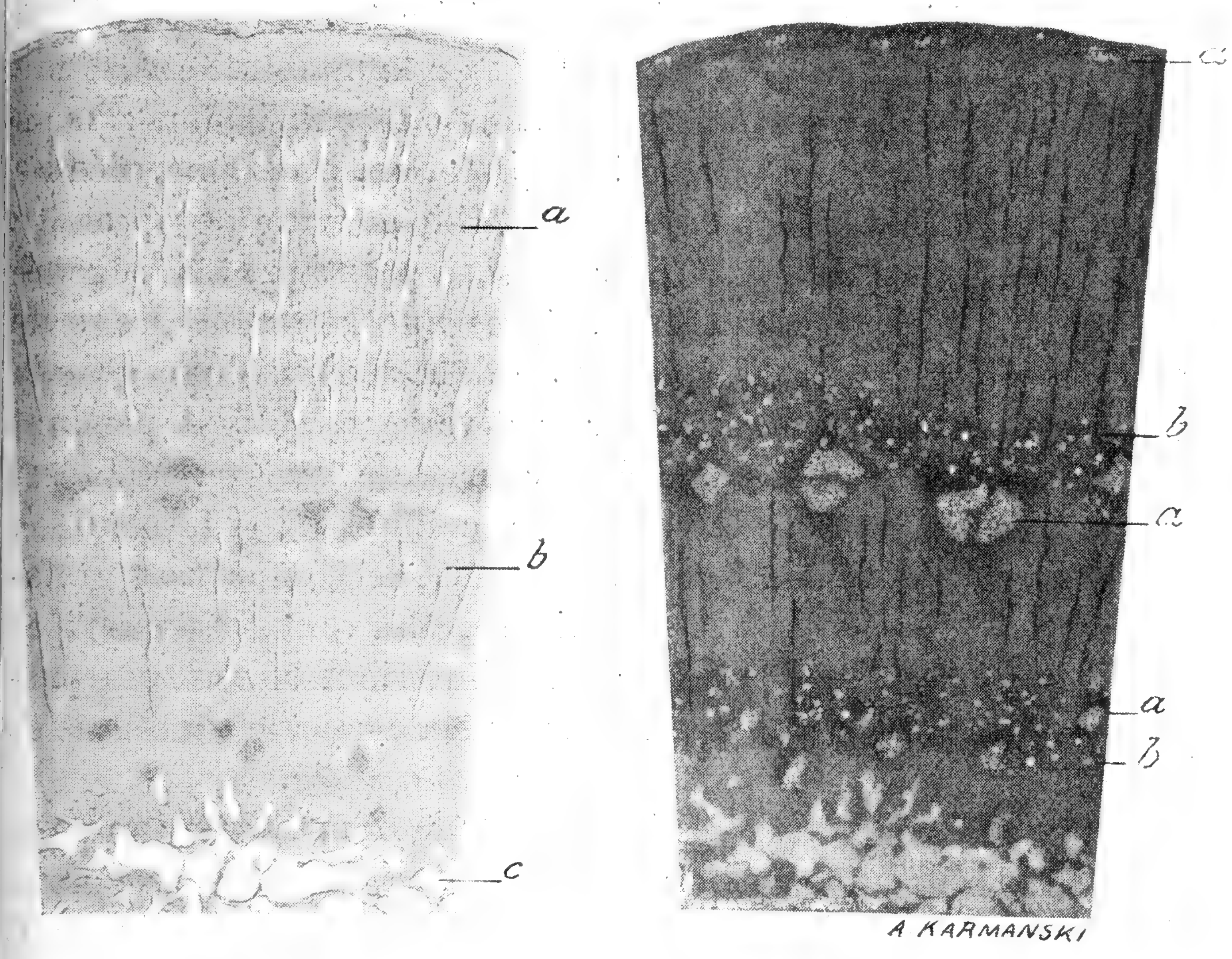


Figure 8. Figure 8 *bis*.

Fig. 8. — Cobaye 13 (cent heures). Coupe par congélation, non colorée : *a*) spongieuse; *b*) fasciculée et réticulée ; *c*) médullaire.

Fig. 8 *bis*. — Cobaye 13. Même préparation vue en lumière polarisée : *a*) Amas de cholestérine présentant au fort grossissement la croix de polarisation; *b*) Cristaux biréfringents, qui sont peut-être des acides gras.

sauf dans quelques assises cellulaires externes; mais elles sont apparues en quantité considérable au niveau des anciennes couches maigres. Elles ont augmenté dans la glomérulée.

La cholestérine a disparu totalement dans plusieurs cas. En C 13 et C 28, *elle apparaît en minime quantité dans la nouvelle zone grasse.*

Lorsque l'évolution a été plus longue, comme en C 32, la dégénérescence cellulaire des couches internes est plus intense, la graisse y est en diminution ; par contre, la réaction glomérulaire est plus manifeste et une nouvelle zone grasse se forme dans la spongieuse externe. *On y trouve parfois de la cholestérine en petite quantité.*

Le pigment de la zone réticulée a presque totalement disparu.

La disposition que nous décrivons ici est très comparable à celle que Goormachtigh a décrite chez un homme atteint d'une gangrène gazeuse ayant évolué en trois ou quatre jours ; mais nous ne pouvons adopter son interprétation. La glomérulée ne relève pas la fasciculée dans son rôle. Elle ne fait que reprendre le rôle qui lui est dévolu et qui consiste à participer à la régénération de la couche spongieuse. Après une infection grave de trois ou quatre jours, la spongieuse débarrassée d'une grande partie de ses graisses se régénère activement, et c'est pendant cette période que la fasciculée se charge de graisse. Mais cet effort vicariant dépasse la vitalité des cellules de la fasciculée ; cette couche s'atrophie. A ce moment déjà, de nombreuses graisses réapparaissent dans la spongieuse, elles vont s'y accumuler progressivement de l'extérieur vers l'intérieur suivant un processus qui est le même chaque fois que la corticale surrénale se charge de graisse.

Il ne peut donc être question à ce stade d'une inversion de la corticale. L'inversion existe au stade précédent tel que nous l'avons décrit, et c'est la fasciculée qui relève temporairement la spongieuse dans son rôle. Rien n'autorise non plus Goormachtigh à affirmer que la cholestérine réapparaît dans la corticale parce qu'il y trouve des îlots de graisse labile. Des graisses neutres insuffisamment fixées par l'acide osmique, ou dissoutes par les réactifs, peuvent parfaitement donner cet aspect. L'examen en lumière polarisée, par la méthode de la biréfringence peut seul donner la certitude et Goormachtigh n'a pas utilisé cette méthode. Pour la même raison, la topographie des graisses de la corticale humaine normale, telle que cet auteur l'a décrite, est sujette à caution.

Il est fort possible qu'une notable partie des graisses qui apparaissent dans la zone interne après deux, trois ou quatre jours

d'infection, soit originaire de la spongieuse. Nous ne croyons pas cependant que toutes les graisses aient cette origine; d'abord parce que les substances grasses de la fasciculée et de la réticulée sont souvent très nombreuses, alors qu'une notable partie des graisses de la spongieuse se perd dans la circulation générale, ensuite parce qu'il est fréquent de trouver une quantité abondante de graisses dans les couches internes sans que les capillaires en contiennent beaucoup.

Quant à la cholestérine, qui réapparaît dans quelques cas au niveau de la même zone interne, nous croyons qu'elle n'est jamais d'origine spongieuse. En effet, nous n'en trouvons jamais dans les stades de début, alors qu'elle est déversée dans le sang avec la graisse en grande quantité et alors que ces graisses font leur apparition dans la zone interne. Nous n'avons trouvé de cholestérine dans la fasciculée et réticulée qu'aux stades tardifs, lorsqu'elle avait disparu depuis longtemps de la spongieuse et lorsque les anciennes zones maigres étaient devenues depuis de nombreuses heures une couche grasse. *C'est ce qui nous porte à croire que la cholestérine a été produite sur place à ce niveau.*

2° *Hypophyse.*

La congestion est toujours assez intense, mais nous n'avons jamais observé d'hémorragies. Il y a parfois dans le lobe épithélial une légère infiltration leucocytaire.

Sur les coupes colorées à l'hématéine-éosine, on ne trouve que fort peu de cellules éosinophiles; les cellules colorées en violet pâle, cellules cyanophiles, sont nombreuses, mais la majeure partie des cellules ne présente aucune coloration. Sur les coupes colorées à l'hématoxyline au fer, ces cellules incolores se teintent en violet foncé. Ce sont les cellules sidérophiles de Launois et Mulon dont le nombre a considérablement augmenté. Parfois dans les capillaires on trouve des granulations sidérophiles.

Ces modifications sont d'autant plus marquées que la survie a été plus longue. Il semble que l'on puisse conclure à un hyperfonctionnement de la partie épithéliale de l'hypophyse.

Nous n'avons pas trouvé de modifications dans le lobe nerveux.

3° *Thyroïde.*

Les lésions de la glande thyroïde sont peu importantes. La congestion est modérée. Les vésicules apparaissent toujours bien remplies de substance colloïde. Dans les cas où la survie a été assez longue (quarante-huit heures), il y a souvent une légère desquamation épithéliale. L'hyperexcrétion est loin d'être la règle. Nous l'avons observée dans deux ou trois cas. Dans les autres thyroïdes, nous n'avons mis en évidence aucun changement fonctionnel appréciable.

Ces modifications de l'hypophyse et de la thyroïde sont les mêmes dans toutes les infections anaérobies. Nous ne reviendrons plus sur les lésions de ces organes dans les expériences qui suivent.

II. — Gangrène gazeuse à vibrion septique.

Cobayes injectés avec une culture pure de vibrion septique (culture de seize à vingt-quatre heures en bouillon glucosé à 0,5 p. 1.000, 9 cobayes : 1, 7, 10, 14, 18, 20, 55, 59, 62), ayant succombé en un temps variant de dix à trente heures.

Les modifications sont absolument comparables à celles que nous avons décrites pour le *Perfringens*. La congestion est toujours très intense au niveau de la médullaire et de la corticale. Il y a une diminution considérable des substances grasses de la corticale et une diminution assez notable de l'éther de cholestérine. Dans la plupart des capsules, le pigment est moins abondant qu'à l'état normal. La réaction chromaffine médullaire a diminué.

III. — Gangrène gazeuse à *B. œdematiens*.

Cobayes injectés avec une culture pure d'*Œdematiens* (culture de vingt-quatre à quarante-huit heures en bouillon non sucré). C 5, C 58 (trente à trente-cinq heures).

La congestion médullaire est très abondante en C 5 et on y trouve de nombreux foyers hémorragiques à la limite de la fasciculée et de la spongieuse. La congestion est moindre en C 58.

La substance médullaire paraît altérée dans les deux cas. Les cellules ont un protoplasme rétracté et un petit noyau.

L'aspect vasculaire de la spongieuse a diminué. Les graisses et la cholestérine ont diminué dans la spongieuse bien qu'en quantité encore considérable. Le pigment est abondant. La réaction chromaffine médullaire est intense.

IV. — Gangrène gazeuse à *B. histolyticus*.

Cobayes injectés avec une culture d'*Histolyticus* (culture de seize heures en bouillon non sucré). C 54 (quatorze heures), C 48 (trente-six heures), C 65 (quarante-cinq heures), C 60 (soixante-douze heures).

Les modifications sont absolument comparables à celles que nous avons déjà décrites. Il est intéressant de constater qu'en C 60 il apparaît de la cholestérine au niveau de la fasciculée.

V. — Association *Perfringens* + *Sporogenes*.

Cobayes : C 38 (16 heures), C 29 (20 heures), C 47 (22 heures), C 46 (36 heures), C 39 (48 heures).

Les lésions hémorragiques ne sont très intenses qu'en C 38. Le médullaire est à peine reconnaissable; la réticulée et la fasciculée sont dissociées. Dans les autres cas, il n'y a que de la congestion surtout marquée à l'union de la spongieuse et de la fasciculée.

Les modifications des graisses, du pigment et de l'adrénaline sont comparables à celles que nous avons décrites pour le *Perfringens*. Il est intéressant de noter qu'en C 39 (cobaye femelle), il persiste une quantité assez notable de cholestérine bien que la mort soit survenue en 48 heures.

VI. — Association *Perfringens* + *Proteus*.

Cobayes : C 49, C 50, C 51 (10 heures).

Les lésions hémorragiques sont très intenses. Il y a des hémorragies médullaires et corticales, et de nombreuses dégénérescences cellulaires dans la fasciculée, la réticulée et la médullaire.

Les graisses ont fort diminué. Les capillaires sont bourrés de graisse.

VII. — Association *Sporogenes* + *Proteus*.

Cobayes : C 42 (6 heures), C 43 (20 heures), C 45 (36 heures), C 44 (90 heures).

Morphologie. — Les lésions hémorragiques sont très considérables, surtout au niveau de la médullaire et de la réticulée. Toutes les couches sont congestionnées. L'aspect vacuolaire, peu altéré en C 42, est très altéré en C 45 et C 44; de nombreuses cellules de la réticulée et de la fasciculée sont en dégénérescence. Les cellules médullaires paraissent très altérées (dissociation cellulaire et rétraction de noyau).

Graisses et lipoides. — Les substances grasses ont notablement diminué dans la spongieuse. En C 44, elles sont nombreuses au niveau des couches internes.

Cholestérine. — Très diminuée dans la spongieuse. En C 44, il y en a des quantités considérables dans la fasciculée (zone vacuolaire du cobaye femelle), mais aussi dans la réticulée.

Réaction chromaffine. — De nombreuses cellules sont très décolorées.

VIII. — Association *Histolyticus* + *Proteus*.

C 52 (20 heures).

Il y a une congestion très intense surtout marquée à l'union de la spongieuse et de la fasciculée. Les tissus sont dissociés et quelques cellules dégénèrent. De nombreuses cellules sont en dégénérescence dans la réticulée. La moelle est d'aspect presque normal. Quelques cellules semblent en dégénérescence.

IX. — Association *Œdematiens* + *Proteus*.

X. — Association *Vibrion septique* + *Proteus*.

C 57 (50 heures), C 66 (52 heures).

Dans ces deux associations, la congestion est peu accentuée. Il n'y a pas d'hémorragie, pas de dégénérescence cellulaire. La moelle est en bon état.

XI. — Infection par *Proteus*.

Cobaye injecté avec une culture pure de *Proteus*. C 41 (10 heures).

Énormes lésions hémorragiques. La médullaire et la réti-

culée sont dissociées; la fasciculée est congestionnée. De nombreuses cellules dégénèrent.

Les graisses sont encore très abondantes, sous forme de grosses gouttes.

La cholestérine a notablement diminué.

ANIMAUX A LÉSIONS ÉVOLUANT VERS LA GUÉRISON.

Cobaye C 33 (*Perfr.* + Sporog., tué après 60 heures).
— C 26 (*Perfr.* + Sérum, tué après 70 heures).
— C 56 (*Perfr.* + Sporog., tué après 9 jours).
— C 31 (*Perfr.* + Sporog., tué après 90 heures).
— C 35 (*Perfr.* + Sporog., tué après 10 jours).

1° MORPHOLOGIE. — La corticale est congestionnée. La spongieuse a son aspect normal, mais on y décèle de très grosses vacuoles. En C 31 et C 35, la couche spongieuse est hypertrophiée; la glomérulée a des figures de division. La fasciculée est normale. La réticulée a d'assez nombreuses cellules en dégénérescence, surtout en C 35. Il y a des pigments et des granulations sidérophiles,

La médullaire paraît normale.

2° GRAISSES ET LIPOIDES. — Un peu diminuées en C 33, elles paraissent augmentées dans les autres cas. On en trouve beaucoup dans les capillaires.

3° CHOLESTÉRINE. — La cholestérine existe en quantité considérable en C 33 et C 26. Elle paraît diminuée en C 35.

4° RÉACTION CHROMAFFINE. — Elle est assez bien conservée en C 31. Elle paraît à peu près normale en C 35.

En résumé, dans les cas évoluant vers la guérison, les graisses neutres sont plutôt augmentées bien qu'il en passe dans les capillaires. La réaction chromaffine reste voisine de la normale.

CONCLUSIONS

Il résulte de l'ensemble de ces recherches que les modifications des glandes à sécrétion interne dans les infections causées par les microbes anaérobies sont comparables à celles qui ont été observées dans les infections et les intoxications les plus diverses (infections par microbes aérobies, intoxications vermineuses). Les modifications sont peu accusées au niveau de la thyroïde et de l'hypophyse, elles sont très profondes au niveau des capsules surrénales.

Au niveau de la *thyroïde*, la congestion est toujours modérée; nous n'avons observé que dans quelques cas de l'hyperexcrétion, se traduisant par une augmentation de la substance colloïde dans les lymphatiques.

Au niveau de l'*hypophyse*, la congestion est également peu intense. Il y a augmentation des cellules sidérophiles, ce qui semble traduire un hyperfonctionnement glandulaire.

Au niveau de la *surrénale*, dans certaines infections mixtes (Anaérobies + *Proteus*), les lésions hémorragiques ont toujours présenté une gravité extrême. En dehors de ces cas-là, il est plutôt rare que les lésions vasculaires soient assez profondes pour qu'elles puissent à elles seules être la cause d'une insuffisance surrénale. Le plus souvent, les modifications fonctionnelles l'emportent sur les lésions hémorragiques.

Ces modifications portent aussi bien sur la couche corticale que sur la couche médullaire.

Au niveau de la couche corticale, elles se caractérisent par la *décharge des substances grasses de la spongieuse dans le sang.* La spongieuse s'appauvrit au point de perdre toute sa cholestérine, en quarante-huit heures environ. *Les graisses neutres disparaissent plus lentement. Elles persistent et même augmentent dans la glomérulée et les quelques assises cellulaires voisines. Elles apparaissent en quantité notable dans les couches maigres internes. Ces couches se déchargent de leurs granulations pigmentaires.* Dans quelques cas, *on peut voir apparaître au niveau de ces nouvelles couches grasses une faible quantité de cholestérine.* Nous croyons que cette cholestérine est produite par la capsule surrénale, nous en avons exposé plus haut les raisons.

Il nous semble que cette apparition de cholestérine en pleine infection, à un endroit où à l'état normal on n'en trouve jamais dans la capsule, confirme l'opinion de Mulon, de Chauffard, Guy Laroche et Grigaut, sur le *rôle cholestérinogène de la surrénale.*

Lorsque la survie de l'animal est plus longue et atteint sept à huit jours, on constate que les graisses accumulées dans la fasciculée et la réticulée diminuent et que ces couches s'atrophient ; mais la spongieuse reprend son rôle et se recharge de graisses. *C'est une tentative de retour à l'état normal.*

Au niveau de la couche médullaire, les modifications ne sont

pas moins profondes. Dans la plupart des cas, le *pouvoir chromaffine des cellules est très réduit* et les dégénérescences cellulaires sont fréquentes. Nous n'avons jamais trouvé de processus d'hypersécrétion tels que Goormachtigh les a décrits dans la gangrène gazeuse chez l'homme.

Il est donc logique d'admettre que, dans la plupart des cas que nous avons observés, lorsque les animaux ont présenté une survie suffisante pour avoir le temps d'ébaucher la lutte contre l'infection, il y ait eu à la fois *insuffisance corticale* par défaut de cholestérine et insuffisance *médullaire* par *affaiblissement* de la sécrétion d'adrénaline.

L'hypothèse de M. Weinberg, que nous énoncions au début de ce travail, trouve sa confirmation dans les faits que nous avons mis en évidence, et nous croyons qu'il y aurait un réel intérêt dans les cas graves à essayer de renforcer le traitement sérothérapique par l'addition d'adrénaline.

Quant au rôle de la cholestérine dans la lutte contre l'infection, le fait que, dans plusieurs cas, notamment chez des cobayes femelles ayant succombé à l'infection, il persiste une quantité abondante de cholestérine dans la corticale, tend à prouver que cette substance, tout en jouant un rôle probablement important dans la neutralisation des toxines, ne peut pas à elle seule protéger l'organisme contre l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

ASCHOFF, Zur Morphologie der Lipoïdensubstanzen. *Ziegler*, 1910, **97**.

ALBRECHT et WELTMANN, Ueber das Lipoïd der Nebennierenrinde. *Wien. klin. Woch.*, 1911, **14**.

BEDSON, Lésions des organes à sécrétion interne dans l'intoxication vermineuse. Ces *Annales*, 1913.

BERNARD et BIGART, Etude anatomo-pathologique des surrénales dans quelques intoxications expérimentales. *Journ. de Physiol. et de Path. gén.*, 1902.

— Lésions des glandes surrénales au cours de l'intoxication biliaire expérimentale. *C. R. Soc. de Biol.*, 1906, p. 410.

BIDEL. *Innere Sekretion*, Berlin, 1913.

BOGOMOLEZ, Zur Frage über die Veränderungen der Nebenniere bei experimenteller Diphterie. *Ziegler*, 1905, **38**.

— Ueber die Hypersekretion von Lipoïdsubstanzen durch die Rinde der Nebenniere bei experimentellem Botulismus. *Zeitsch. f. Immunitatsf*, 1910, **8**.

CHARRIN et LANGLOIS. *C. R. Soc. de Biol.*, 1893, p. 812; 1894, p. 99; 1896, p. 131.

CHAUFFARD, GUY LAROCHE, et GRIGAUT, Le taux de la cholestérine dans les infections. *C. R. Soc. de Biol.*, 1911, p. 20, 70, 108, 536, 568, 855.

Chauffard, Guy Laroche et Grigaut, Les lipoïdes en pathologie. *Rapport au XIVe Congrès français de médecine*, Bruxelles, 1920.

Dietrich, Nebennieren bei den Wundinfektionskrankheiten. *Centralb. f. allg. Pathol.*, 1918.

Elliot et Tucket, Cortex and Medulla in the suprarenal glands. *Journ. of. Physiol.*, 1906, **34**.

Geringer, Ueber Nebennierenveränderungen bei Gasbrand. *Wien. klin. Woch.*, 1917, n° 30.

Goormachtigh, Les capsules surrénales dans la gangrène gazeuse. *Arch. de Méd. expér.*, 1918.

Grigaut, Le cycle de la cholestérinémie, *Thèse de Paris*, 1913.

Guieysse, La capsule surrénale du cobaye. *Thèse de Paris*, 1901.

Kawamura. *Die Cholesterinesterverfettung*, 1911.

Krylow, Experiment. Studien über Nebennierenrinde. *Ziegler*, 1914.

Landau, Nebenniere und Fettstoffwechsel. *Deutsche med. Woch.*, 1912-1913.

Landau et Mac Nee, Zur Physiol. des Cholesterinstoffwechsels. *Ziegler*, 1914.

Launois et Mulon, Cellules cyanophiles de l'hypophyse. *C. R. Soc., de Biol.*, mars 1903.

Launois, Cellules sidérophiles de l'hypophyse. *C. R. Soc. de Biol.*, mars 1903.

Luksch, Funktionstörungen der Nebennieren bei Intoxikationen und Infektionen. *Wien. klin. Woch.*, 1905, **14**.

(A.) Marie, Glande surrénale et toxi-infection. Ces *Annales*, mars 1918.

Mulon, Sur le pigment des capsules surrénales. *C. R. de l'Assoc. des Anatomistes*, Liége, 1903.

— Modification de la corticale surrénale du cobaye avec l'âge de l'animal. *C. R. Soc. de Biol.*, 28 octobre 1905.

— Excrétion des capsules surrénales. *C. R. Soc. de Biol.*, 27 décembre 1902.

— Action de l'acide osmique sur les graisses. *Bibliogr. anatomique*, fasc. 4, **13**.

— Divisions nucléaires de la couche glomérulaire des capsules surrénales du cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, 9 mai 1903, 9 décembre 1905.

— Spécificité de la réaction chromaffine. *C. R. Soc. de Biol.*, 23 janvier 1904.

— Sur une localisation de la lécithine dans les capsules surrénales du cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, 17 janvier 1903.

Pirone, Altération de l'hypophyse et de la surrénale dans la rage. *Arch. de méd. expérim.*, 1911, p. 127.

Porak, L'hypertrophie et la teneur en adrénaline des surrénales dans les infections, les intoxications et certains états d'immunité. *Journ. de Physiol. et de Path. gén.*, 1919, n° 1.

Reichtmann, Cité d'après Bogomolez.

Roger et Garnier, Neue Untersuchungen über den Zustand der Schilddrüse bei den Pocken. *Virchows Archiv*, 1903, **74**.

— La glande thyroïde dans les maladies infectieuses. *Presse Médicale*, avril 1899.

Simonds, Die Schilddrüse bei akuten Infektionskrankheiten. *Ziegler*, 1916.

Weinberg et Séguin. *La gangrène gazeuse*, Paris 1920.

Weltmann, Ueber das doppeltbrechende Lipoïd der Nebenniere. *Ziegler*, 1913, **56**.

Wybauw, Cité d'après Bogomolez.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Juillet — N° 7.

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6e).

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU

BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR

25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs ; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921.	France	**45 fr.**
— — — —	Union Postale.	**55 fr.**
Prix du numéro, — —		**4 fr.**

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément **28** francs. Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément. Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 7

Pages.

Mémoires publiés à l'occasion du Jubilé de Élie Metchnikoff, réunis en un volume grand in-8° de 724 pages et 20 pl. en noir et en couleurs, précédés du compte rendu du Jubilé du 16 mai 1915, avec portrait de E. Metchnikoff. — Paris, Masson et C[ie], 50 francs.

P. LEQUEUX*, Ingénieur des Arts et Manufactures

Maison WIESNEGG, 64, rue Gay-Lussac, Paris

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de médecine de Paris

STÉRILISATEURS, ÉTUVES, APPAREILS DE DÉSINFECTION

Installations de Laboratoires de bactériologie.

Exposition univ. Paris 1900 : DEUX GRANDS PRIX



ÉTABLISSEMENTS GONIN



Produits, Procédés
et
APPAREILS
pour la
DÉSINFECTION
en surface, en profondeur et par lavages ou trempages.

APPROUVÉS
par le Conseil supérieur d'Hygiène publique de France,
AUTORISÉS
conformément à la loi par M. le Ministre de l'Intérieur.

FUMIGATORS GONIN

N° 3 pour 15 m³
N° 4 pour 20 m³

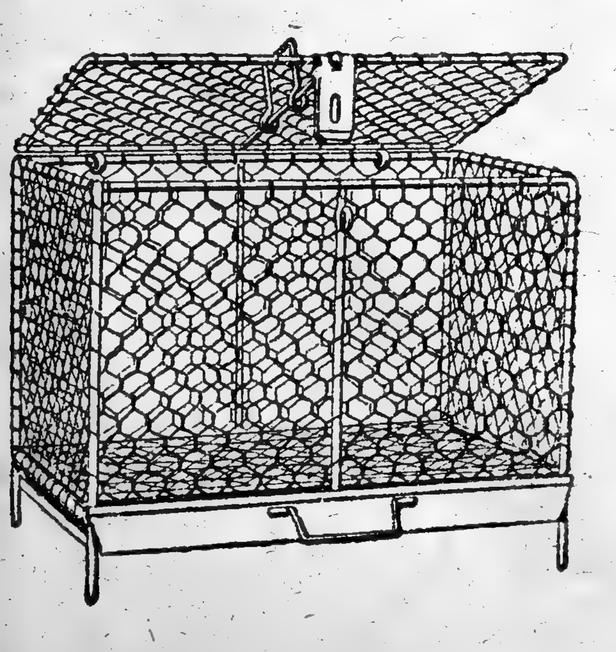
Cartouches auto-productrices d'aldéhyde formique

CRESYLOL SODIQUE GONIN — FLUOFORMOL GONIN
NITIDOL GONIN

ÉTUVES de tous chauffages, fixes et transportables, à basse température, sans pression, utilisant le formol.

Adresser toute la correspondance
à M. le Directeur des Etablissements GONIN
60, Rue Saussure, PARIS (17e)

Adresse telégr. : FUMIGATOR-PARIS
Téléph. : WAGRAM 17-23



FABRIQUE DE GRILLAGES
ET DE CAGES
pour Études Bactériologiques

CHENILS ET VOLIÈRES

PAUL PIARRETTE

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine

17, rue Séguier, 17, Paris (6e)

35e ANNÉE JUILLET 1921 N° 7

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

VACCINATION PAR VOIE CUTANÉE.

CHARBON :
CUTI-INFECTION, CUTI-VACCINATION, CUTI-IMMUNITÉ

par A. BESREDKA.

Le procédé classique de vaccination anticharbonneuse, qui réussit si bien chez les grands animaux, échoue presque toujours chez les petits animaux de laboratoire. Dès qu'on dépasse la dose minima mortelle (1/8 de cent. cube du deuxième vaccin chez le cobaye ou une fraction minime de cent. cube de virus chez le lapin), il est exceptionnel que ces animaux résistent, quel que soit le soin que l'on apporte à les rendre réfractaires. Qu'on soumette le cobaye à une préparation pendant de longs mois, que cette préparation soit aussi graduelle que possible, qu'elle soit pratiquée par les voies sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse, le résultat est invariablement le même, il est nul.

A la suite de nos recherches sur l'immunité locale de l'intestin (1) et des poumons (2), nous nous demandâmes si une

(1) Ces *Annales*, **33**, mai 1919, p. 301; *Ibid.*, août 1919, p. 557; *Ibid.*, décembre 1919, p. 882.
(2) Ces *Annales*, **34**, janvier 1920, p. 51; *Ibid*, juin 1920, p. 362.

immunité de même ordre n'existerait pas pour d'autres organes, pour la peau notamment.

Le meilleur réactif pour cette étude nous a paru être la bactéridie charbonneuse.

Dès le début de ces recherches, notre attention fut attirée par la façon dont l'appareil cutané réagissait à l'égard des vaccins charbonneux, surtout après une irritation de la peau. Ainsi, lorsqu'on badigeonne la peau fraîchement rasée du cobaye avec un tampon trempé dans une culture du *premier* vaccin, on voit apparaître, dès le lendemain, une réaction inflammatoire caractéristique. Celle-ci ne manifeste aucune tendance à envahir les régions voisines, non badigeonnées; elle persiste quatre à six jours, puis subit une régression graduelle : la peau pâlit, devient souple, et ne laisse subsister aucune trace apparente de l'inoculation.

La réaction est toute autre avec le *deuxième* vaccin. L'application de ce dernier sur la peau rasée d'un cobaye neuf est suivie aussi d'une réaction inflammatoire, mais celle-ci est plus vive que dans le cas précédent. Au lieu de rester limitée au niveau de l'inoculation, le processus gagne les tissus voisins, s'étend de plus en plus et devient rapidement généralisé. Le cobaye périt en l'espace de quatre jours, en moyenne.

Tels sont les caractères de l'infection cutanée au moyen du premier ou du second vaccin anticharbonneux.

* * *

Reprenons le premier de nos cobayes qui, badigeonné avec le premier vaccin, a survécu, et adjoignons-lui un cobaye neuf. Rasons tous les deux en un point déterminé de la cuisse et appliquons-leur sur la peau, encore toute piquetée de rouge, un tampon imbibé du deuxième vaccin.

Dès le lendemain, chez l'un comme chez l'autre, nous ne manquerons pas de constater une réaction locale, plus ou moins accusée. Chez le cobaye témoin, l'infection ne tardera pas à se généraliser et se terminera par une septicémie mortelle ; chez le cobaye antérieurement frictionné avec le premier vaccin, l'infection demeurera circonscrite ; en quelques jours, la peau reprendra son aspect normal.

Laissons s'écouler une dizaine de jours. Reprenons une fois de plus notre cobaye et soumettons-le à une nouvelle épreuve, plus sévère que la précédente : appliquons-lui sur la peau fraîchement rasée un tampon imbibé de virus charbonneux en bouillon.

Une réaction très vive s'ensuivra : la région frottée deviendra rouge, indurée ; il y aura même de l'œdème ; mais tout s'arrêtera là. Malgré la dose de virus, qui serait énorme pour tout animal non préparé, notre cobaye s'en tirera à bon compte et il aura la vie sauve.

Voici, à titre d'illustration, l'histoire de quelques animaux « cuti-vaccinés » :

Cobaye A, 530 grammes. — 2 avril, premier vaccin en friction.
8 avril, deuxième vaccin en friction (le témoin meurt le 12 avril).
23 avril, deuxième vaccin (1/4 cent. cube) sous la peau (le témoin reçoit 1/8 cent. cube et meurt le 27).
5 mai, virus pur en friction.
11 mai, virus pur (1/10 cent. cube) sous la peau. Survit.

Cobaye B, 580 grammes. — 21 avril, premier vaccin en friction.
5 mai, deuxième vaccin en friction.
18 mai, virus pûr en friction.
26 mai, virus (1/10 de cent. cube de culture en bouillon) sous la peau.
2 juin, virus (1 cent. cube) sous la peau.
15 juin, virus (3 cent. cubes) sous la peau.
29 juin, virus (5 cent. cubes) sous la peau.
2 juillet, virus (1 cent. cube de culture sur gélose) sous la peau. Survit.

Par la même voie, cutanée, le lapin se vaccine contre le charbon avec la même facilité, sinon plus facilement, que le cobaye.

Lapin, 2.050 grammes. — 23 avril, deuxième vaccin en friction.
30 avril, virus pur en friction.
11 mai, virus (1/10 cent. cube de culture en bouillon) sous la peau (le témoin meurt le 17).
19 mai, virus (5 cent. cubes de culture en bouillon) sous la peau.
6 juin, virus (4 cent. cubes de culture en bouillon) dans la trachée. Survit.

Chez le lapin, on peut commencer, à la rigueur, par du virus pur, qui est loin d'être toujours fatal en friction ; seulement, il se forme en cas de survie, au niveau de la zone frictionnée, une croûte qui est très longue à se détacher. Le mieux est donc, lorsqu'on n'est pas pressé, de commencer par le deuxième vaccin, puis de passer, dès que la réaction locale est terminée, au badigeonnage avec du virus pur.

L'expérience montre que, à partir du moment où la peau a récupéré son aspect normal, l'animal est solidement vacciné : on peut lui inoculer du virus en n'importe quel point de l'organisme — dans la peau, sous la peau, dans la trachée — à n'importe quelle dose : il ne court plus aucun risque.

* * *

L'immunité anticharbonneuse, aussi solide que celle que nous venons d'indiquer, peut être réalisée par la voie intra-cutanée proprement dite : au lieu d'appliquer les vaccins sur la peau rasée, on arrive tout aussi bien à vacciner le cobaye en injectant le premier vaccin, puis le deuxième, directement dans l'épaisseur de la peau. Ce procédé a l'avantage de permettre un dosage précis des produits à injecter.

Nous rapportons ci-dessous deux exemples qui donnent l'idée des réactions locales et de la marche de la vaccination en pareils cas.

Cobaye C, 510 grammes. — 28 octobre, 1 cent. cube de premier vaccin dans la peau ; 29, la peau est rouge, œdématiée ; 30, la rougeur et l'œdème s'accentuent ; 1er novembre, la peau est rouge violacé ; 2, escarre ; 3, croûte noire sur fond rouge œdématié ; 4, plaque noire de dimensions d'une pièce de 10 centimes ; 5, de dimensions d'une pièce de 25 centimes ; 6, croûte noire épaisse reposant sur un fond rose ; 8, le fond est pâle ; 9, la croûte est encore adhérente ; 10, la croûte commence à se libérer par un de ses bords ; 12, à la place de la croûte qui s'est détachée on voit une ulcération profonde qui saigne. Les jours suivants, la cicatrisation se parachève ; 6 décembre, la peau est normale.

8 décembre, 1/10 de cent. cube de deuxième vaccin dans la peau ; 9, la peau est œdématiée et excoriée par places ; 10, croûte noire mince, légèrement adhérente ; 13, la croûte, en se détachant, laisse voir une grosse ulcération plane en voie de cicatrisation ; 14, et les jours suivants, la cicatrisation se poursuit ; 21, la peau offre un aspect normal,

24 décembre, 1/10 de cent. cube de virus charbonneux dans la peau ; 25, la peau est rouge ; 27, idem ; 29, la peau est redevenue normale.

4 janvier, 1 cent. cube de virus charbonneux sous la peau ; 6, gros œdème rouge ; 10, rien d'anormal. L'animal survit.

Nous voyons que chez le cobaye qui reçoit, en première injection, d'emblée une dose massive (1 c. c.) de premier vaccin dans la peau, la réaction locale est intense et durable. Il ne s'ensuit pas moins une immunité très solide.

Afin d'éviter cette forte réaction de début, nous recomman-

dons d'injecter, la première fois, une dose faible (1/10 de cent. cube) de vaccin. En procédant ainsi, on crée l'immunité en un temps relativement court. En voici un exemple :

Cobaye D, 490 grammes. — 4 novembre, 1/10 de cent. cube de premier vaccin dans la peau; 5, petites érosions cutanées; 6, croûtelle, léger œdème; 9, idem; 10, petite escarre noire; 12, croûte noire sur fond normal; 13, et les jours suivants, la croûte se détache; 25, la peau est normale.

27 novembre, 1/10 de cent. cube de premier vaccin dans la peau (donc, même dose que la première fois); 4 décembre, croûtelle; 6, la peau est normale.

8 décembre, 1/10 de cent. cube de deuxième vaccin dans la peau; 9, la peau est légèrement indurée; 13, la peau est redevenue normale.

17 décembre, 1/10 de cent. cube de virus en bouillon dans la peau; 18, pas de réaction.

24 décembre, 1/2 cent. cube de virus dans la peau; 27, rien d'anormal.

4 janvier, 1 cent. cube de virus sous la peau; 6, œdème; 10, l'œdème a disparu.

11 février, 1 cent. cube de virus dans la peau; 18, le cobaye ne présente rien d'anormal; il est saigné à blanc (voir plus bas).

En résumé, que l'on adopte la voie cutanée proprement dite, c'est-à-dire la friction de la peau rasée, ou que l'on s'adresse à la voie intracutanée, on est sûr de conférer au cobaye une immunité telle qu'il devient réfractaire au charbon inoculé en n'importe quel point de l'organisme.

*
* *

Quel est le mécanisme de cette immunité charbonneuse qui a ceci de particulier qu'elle ne peut être réalisée que par la voie cutanée?

La première idée qui se présente à l'esprit est que le sang des cobayes immunisés renferme des anticorps, lesquels — pour une raison qui nous échappe — ne seraient fabriqués qu'à la suite des injections cutanées.

Sans nous attarder à la recherche de sensibilisatrices et d'agglutinines dans le sang, nous nous sommes empressé de mettre en évidence des propriétés préventives. Un de nos cobayes cuti-vaccinés, ayant acquis vis-à-vis du virus une immunité très solide, fut saigné et son sérum injecté, à titre préventif, à deux cobayes neufs; ceux-ci furent inoculés le lendemain avec une dose mortelle, relativement faible, de charbon.

Cobaye D, cuti-vacciné (voir plus haut), reçoit le 4 janvier sous la peau 1 cent. cube de virus charbonneux; le 11 février, il reçoit la même dose de virus dans la peau. La réaction locale est minime. Le 18, il est saigné à blanc.

Le 18 février, son sérum, après centrifugation, est injecté à deux cobayes neufs sous la peau, à la dose de 1 cent. cube par animal. Le lendemain 19, les deux cobayes préparés sont inoculés sous la peau, l'un avec 1/4 de cent. cube de deuxième vaccin, l'autre avec 1/100 de cent. cube de virus. Deux cobayes témoins sont inoculés dans les mêmes conditions.

Les deux cobayes préparés sont morts (22 et 23 février) avec de l'œdème caractéristique et des bactéridies dans le sang, après un délai sensiblement égal à celui observé pour les deux témoins (21 et 22 février).

Il ressort de cette expérience que le sang du cobaye cuti-vacciné ne possède pas de propriétés préventives. L'immunité de ce cobaye ne repose donc pas sur la présence des anticorps spécifiques.

Il ne semble pas, de prime abord, qu'il s'agisse d'une immunité locale dans le genre de celle qui caractérise, par exemple, l'abrine. L'immunité à l'abrine, que l'on crée au niveau de la conjonctive oculaire, ne s'étend pas à l'animal tout entier. Non seulement ce dernier n'en bénéficie point, mais ce qui est plus, l'immunité acquise par la conjonctive préparée ne s'étend pas sur la conjonctive de l'autre œil, laquelle reste aussi sensible à l'abrine que celle d'un animal neuf.

Or la cuti-vaccination contre le charbon, qui confère une réelle immunité à l'animal, n'a donc — du moins en apparence — rien de l'immunité strictement locale, qui est propre à la vaccination de l'œil contre l'abrine.

A un moment donné nous nous sommes demandé si ce ne sont pas les leucocytes qui, après être accourus vers la peau au cours de la vaccination, ne deviendraient pas, en s'en retournant dans les organes, distributeurs du principe de l'immunité dans l'économie. Cette idée ne nous a pas retenu longtemps; elle a fait bientôt place à une autre que nous allons exposer.

*
* *

Le point de départ de notre hypothèse est que chez le cobaye il n'existe qu'un organe pour lequel la bactéridie ressent une réelle affinité, organe dans lequel elle peut s'implanter, au sein duquel elle peut croître et se multiplier : cet organe est la peau. En dehors de la peau, nous sommes-nous dit,

la bactéridie est vouée à la mort partout où elle pénètre.

Nul n'ignore cependant, nous pourrait-on faire remarquer, que le cobaye succombe à l'inoculation intrapéritonéale ou intratrachéale, tout aussi bien qu'à l'inoculation cutanée ou sous-cutanée.

Certes, le cobaye périt du charbon invariablement, quelle que soit la porte d'entrée du virus ; mais, — et c'est là le nœud de la question — il périt toujours, à notre avis, de par la peau. Que l'on inocule le virus dans le péritoine, que l'on en introduise dans la trachée ou ailleurs, on ne manque jamais de constater de l'œdème au point où la peau a été traversée par l'aiguille inoculatrice.

Or, cet œdème est dû à ce que, au cours de ces diverses opérations, on n'a pas su respecter la peau ou le tissu sous-cutané. Involontairement, soit en introduisant l'aiguille pour inoculer le virus, soit en la retirant, on blesse et on souille la peau. Cette blessure gratuite que l'on fait à l'animal, à l'aller et surtout au retour, lui est fatale, car un cobaye touché à la peau avec du virus est un cobaye touché mortellement.

Si cette hypothèse, que nous venons d'énoncer, est vraie, on doit pouvoir injecter impunément le virus, pour peu qu'on évite de contaminer l'appareil cutané :

Cobaye, 465 grammes, reçoit en *injection intratrachéale*, sans que l'on souille la peau, 1/4 de cent. cube de virus charbonneux en bouillon. Survit, sans avoir présenté la moindre réaction, ni locale, ni générale.

Cobaye, 415 grammes, reçoit en *injection intrapéritonéale*, sans que l'on souille la peau, 2 cent. cubes de virus charbonneux. Ne présente aucun trouble. Survit.

Cobaye, 540 grammes, reçoit en *injection intraveineuse*, sans que l'on souille la peau, au moyen d'une très fine aiguille, 1/4 de cent. cube de virus charbonneux dans les veines de l'oreille que l'on chauffe légèrement pour faire mieux apparaître les vaisseaux. Nullement incommodé, l'animal survit définitivement.

Cette opération réussit plus facilement chez le *lapin* auquel nous pouvons injecter impunément dans la veine marginale de l'oreille 1 cent. cube de virus, en prenant les précautions d'usage et en cautérisant le point d'inoculation dès que la canule est retirée.

Nous voyons donc que si l'on fait l'injection, en ayant bien soin de ne pas toucher à la peau, on peut administrer à l'animal une multitude de doses mortelles sans même l'incommoder.

L'opération est délicate, il est vrai; elle peut ne pas réussir. L'œdème, qui apparaît presque toujours au niveau de la piqûre en pareil cas, est l'indice de la faute opératoire commise.

Nous dirons donc, d'après les expériences qui viennent d'être relatées, que la réceptivité du cobaye vis-à-vis du charbon réside principalement, sinon entièrement, dans son appareil cutané (1). Le cobaye infecté avec du charbon ne meurt pas, parce qu'il fait une septicémie d'emblée; il meurt, parce qu'il a sa peau infectée; la septicémie ne vient qu'après.

A la lumière de cette conception, on comprend pourquoi un cobaye cuti-vacciné fait montre d'une immunité si remarquablement solide; on comprend notamment pourquoi l'immunisation locale, n'intéressant que la peau et non suivie de formation d'anticorps, confère néanmoins une immunité générale, s'étendant à l'organisme tout entier. C'est que chez le cobaye il n'existe en réalité qu'un seul organe sensible, son appareil cutané. Du moment où cet organe est vacciné, l'animal n'a plus rien à redouter : le virus a beau venir le frapper dans le péritoine, par la voie respiratoire, ou même sanguine, le cobaye lui oppose la barrière de sa peau vaccinée d'abord, puis, l'état réfractaire naturel de ses autres organes.

Fait intéressant, le cobaye neuf qui tolère, en injection péritonéale ou trachéale, des doses énormes de virus, n'en tire aucun bénéfice quant à sa résistance ultérieure au charbon. Il résulte, en effet, de nos expériences, que, recevant sous la peau une dose mortelle de virus, il périt dans les mêmes conditions qu'un cobaye qui n'avait jamais rien reçu. La bactéridie, qui pénètre ailleurs que dans la peau ou le tissu sous-cutané, passe évidemment inaperçue de l'animal : aussitôt arrivée — dans le péritoine ou dans les poumons — elle y est aussitôt phagocytée et digérée. Sa destruction doit être rapide et totale, car l'animal n'en conserve aucun souvenir.

L'immunisation de l'organe contre le virus marche de pair avec sa sensibilité envers ce virus; ainsi, à la « cuti-infection » charbonneuse répond la « cuti-immunité ».

(1) Par appareil cutané, nous entendons la peau proprement dite et le tissu cellulaire dont il est impossible de la séparer.

CONCLUSIONS

1° Appliqué sur la peau rasée, ou injecté dans l'épaisseur de la peau, le premier vaccin charbonneux donne lieu, chez le cobaye, à une lésion locale curable.

2° Dans les mêmes conditions, le deuxième vaccin donne lieu, chez un cobaye normal, à une réaction cutanée, suivie de septicémie mortelle.

3° Chez le cobaye ayant déjà reçu le premier vaccin dans la peau, l'application cutanée du deuxième vaccin est sans gravité : la réaction reste localisée au niveau de l'inoculation.

4° L'animal ayant résisté au deuxième vaccin, en friction ou dans la peau, survit à l'inoculation de ce même vaccin sous la peau. Dans la suite, il supporte l'inoculation du virus, aussi bien par la voie sous-cutanée que par la voie intracutanée.

5° Le lapin se laisse vacciner contre le charbon avec la même facilité que le cobaye, par la voie cutanée.

6° Le sérum des cobayes cuti-vaccinés ne renferme pas d'anticorps capables de protéger le cobaye neuf contre l'infection charbonneuse.

7° La sensibilité du cobaye neuf vis-à-vis du charbon repose sur celle de son revêtement cutané. Le cobaye neuf est réfractaire à l'inoculation de charbon par toute voie autre que la voie cutanée. Il est de même réfractaire à la vaccination par toute voie autre que la voie cutanée.

8° La cuti-vaccination, en assurant l'immunité locale, a pour effet, paradoxal en apparence, de conférer à l'animal l'immunité générale. Cette dernière est due au concours de deux facteurs : à l'immunité de la peau acquise par la vaccination et à l'état réfractaire naturel de tous les autres organes.

*
* *

Une remarque pour terminer.

N'est-ce pas le cobaye que l'on cite couramment comme l'animal doué d'une extrême sensibilité envers le charbon? N'est-ce pas au cobaye que l'on a fait une réputation de ne

pas se laisser immuniser contre le charbon? Il est même classique d'ajouter que, si la vaccination du cobaye est impossible, c'est parce que cet animal est d'une réceptivité extraordinaire envers le virus.

Or, nous savons maintenant que le cobaye se montre extraordinairement résistant au charbon, si l'on prend la précaution d'éviter l'introduction de la bactéridie dans la peau; nous savons, de plus, aujourd'hui que son immunisation est extrêmement facile, si l'on a soin de vacciner la peau.

Une nouvelle notion s'impose donc au cours des recherches sur l'infection et sur l'immunité : c'est la notion relative à l'*autonomie des organes*. Chaque fois que nous sommes en présence d'un agent infectieux ou toxique, prenons l'habitude de nous demander non seulement si l'animal est sensible, mais encore s'il ne possède pas un organe particulièrement réceptif; de plus, si, en vaccinant électivement cet organe, on n'arriverait pas à immuniser l'animal tout entier.

Dans nos recherches antérieures, nous avons montré la part prédominante qui est dévolue, au cours de certaines maladies infectieuses, à l'immunité locale de l'*intestin* et des *poumons*. Le cobaye charbonneux nous offre un bel exemple de l'autonomie de la *peau* devant l'infection et l'immunité, tant acquise que naturelle.

LE ROLE DES MOUCHES DANS LE TRANSPORT DES GERMES PATHOGÈNES ÉTUDIÉ PAR LA MÉTHODE DES ÉLEVAGES ASEPTIQUES (1)

par E. WOLLMAN.

L'idée que les mouches (2) jouent un rôle dans la propagation des maladies infectieuses est très ancienne. Au XVI[e] siècle, pour ne pas remonter plus loin, Ambroise Paré et Mercurial leur attribuaient un rôle dans la dissémination du virus de la peste ; au XVII[e], Sydenham croyait à un rapport entre l'abondance des mouches et la morbidité. Cette idée a pris corps avec la découverte des microbes pathogènes. Par son genre de vie, par ses habitudes, par les particularités de sa structure anatomique, la mouche semble, en effet, tout particulièrement adaptée au transport de germes de toute nature. Elle fréquente indifféremment les détritus de toute sorte, les excreta, les sécrétions pathologiques ou normales. « Ses pattes sont de véritables petites brosses en miniature qu'aucun nettoyage ne semble plus pouvoir débarrasser des germes ramassés (3). »

De fait, tout au début de l'ère bactériologique, Raimbert (1869) [4] et Davaine (1870) [5] établissaient expérimentalement qu'on pouvait communiquer le charbon aux animaux en déposant sur la peau excoriée des mouches qui s'étaient nourries de sang charbonneux, ou en inoculant sous la peau les pattes et les trompes de ces mouches.

D'autres recherches déjà anciennes de Maddox (6), de Sawt-

(1) *C. R. Ac. Sc.*, **172**, p. 298.

(2) En parlant de mouches, nous avons surtout en vue la mouche domestique et, accessoirement, les types voisins : *Calliphora*, *Lucilia*, etc.

(3) Hewitt. *Houseflies and how they spread disease*, Cambridge, 1912.

(4) *C. R. Acad. Sciences*, **69**.

(5) *Bull. Acad. Méd.*, **35**.

(6) *Journ. R. Micr. Soc.*, **5**, 1883.

chenko (1), de Simmonds (2), signalent la présence du vibrion cholérique dans les fèces de mouches qui avaient absorbé cette bactérie. Celli (3) aurait isolé le bacille typhique dans les mêmes conditions. Malheureusement, étant donnée l'imperfection des méthodes de diagnostic dont on disposait au moment de ces recherches, les résultats perdent une grande partie de leur valeur.

La question a été reprise plus récemment, avec des méthodes modernes. De nombreux chercheurs se sont efforcés de préciser les conditions dans lesquelles se faisait la dissémination des microbes par les mouches ; la durée de survie des différents germes pathogènes dans l'intestin et à la surface du corps de ces insectes; le sort des germes englobés à l'état de larves. Nous commencerons par résumer les recherches consacrées à cette dernière question.

Les larves de mouches se développent, entre autres, dans les cadavres et les excréments ; elles peuvent donc, dès ce stade, être contaminées par des germes pathogènes. Ceux-ci se retrouvent-ils chez l'insecte adulte? La question a son importance, et pour Galli-Valerio, notamment, un tel passage expliquerait la recrudescence, à des périodes espacées, de certaines épidémies (4). Elle semble avoir été abordée expérimentalement pour la première fois par Cao (5) en 1906.

Cet auteur aurait retrouvé chez la mouche adulte des germes (*Bactéridie charbonneuse*, *B. prodigiosus*, *B. fluorescens*, *sarcines*, *staphylocoques*) administrés aux larves. N'ayant pu retrouver le travail original, nous ne savons pas si toutes les précautions avaient été prises contre la réinfection des mouches nouvellement écloses. Nous ferons remarquer toutefois que certaines des bactéries employées appartiennent à la flore banale des mouches, ce qui introduit une source d'erreur considérable.

Quelques années plus tard Faichnie (6) émettait à son tour

(1) Analysé dans ces *Annales*, **7**, p. 222.
(2) *Deutsch. med. Woch.*, 1892.
(3) Cité d'après Graham-Smith. *Flies in relation to disease*, p. 129.
(4) L'état actuel de nos connaissances sur le rôle des mouches, etc. *Centralbl. f. Bakt.*, **54**, p. 193, 1910.
(5) Cité d'après Krontowski, *Centralbl. f. Bakt.*, **68**, p. 586, 1913.
(6) *Journ, R. Army med. Corps*, **13**, 1909 (d'après Graham-Smith, p. 114).

l'hypothèse de la survie, chez l'insecte parfait, des germes englobés par les larves. Le fait expliquerait, d'après lui, certaines particularités d'une épidémie de typhoïde qu'il venait d'observer à Kamptée, Indes anglaises. Pour le vérifier il institua les expériences suivantes.

Des mouches provenant de larves élevées sur des matières fécales typhiques (paratyphiques dans une autre expérience) furent flambées, lavées dans de la solution physiologique, puis écrasées. Alors que l'eau de lavage ensemencée dans du bouillon n'a pas donné de culture pendant quarante-huit heures, les mouches écrasées, âgées de un à seize jours, donnèrent toutes des cultures de *B. typhique*. Faichnie en conclut que les bacilles typhiques et paratyphiques englobés par les larves se retrouvent dans l'intestin de l'insecte parfait. Malheureusement, les matières fécales étant restées dans la boîte d'élevage jusqu'à l'éclosion des mouches, rien ne permet d'exclure l'infection de celles-ci après éclosion. D'autre part, l'identification des germes isolés n'a été faite que d'après leurs caractères biochimiques (milieu de MMc Conkey). Nous verrons plus loin que ceux-ci ne suffisent pas pour différencier les bacilles typhiques et paratyphiques de certains germes de la flore normale de la mouche.

Bacot (1) reprend les expériences de Faichnie. Pour parer à la difficulté que nous venons de signaler, il contamine les larves de mouche domestique avec un germe facile à identifier : le *B. pyocyanique*. Les pupes sont désinfectées au lysol, lavées dans un premier tube de bouillon et écrasées ensuite dans un deuxième tube. Le deuxième tube seul donne une culture abondante de *B. pyocyanique* dans tous les cas, le premier donnant une culture discrète dans quelques cas seulement. Quelques mouches écloses ont été traitées de la même façon. Dans une partie des cas, seul le dernier tube de bouillon, dans lequel les mouches furent écrasées, donne une culture de *B. pyocyanique*. Ces expériences établissent la persistance du *B. pyocyanique* à l'intérieur des pupes. Son passage chez les mouches nous semble moins certain, étant donné que la surface des pupes n'avait pas été stérilisée avant l'éclosion

(1) *Parasitologie*, 4, 1911.

et que l'infection au cours de celle-ci est toujours possible. Quoi qu'il en soit, Bacot conclut de ses expériences que l'hypothèse du passage de germes pathogènes de la larve à la mouche mérite d'être prise en considération. Ledingham (1) a pu, avec une technique un peu différente, confirmer les résultats de Bacot sur la persistance du *B. pyocyanique* à l'intérieur des pupes.

Par contre, dans une série d'expériences sur le *B. typhique* (2), cet auteur n'a pu retrouver ce germe ni chez les pupes, ni chez les insectes parfaits. Seule, une expérience dans laquelle les œufs avaient été stérilisés au lysol et les larves nourries de sang mélangé de *B. typhique* a permis de retrouver le bacille à l'intérieur d'une pupe : il n'y a pas eu éclosion de mouches. Ledingham insiste sur les difficultés que présente l'isolement du *B. typhique* par suite de la présence chez la mouche de bactéries dont les colonies sont identiques à celles du bacille d'Eberth.

Graham-Smith (3), auquel nous devons les recherches les plus complètes sur le transport des germes par les mouches, a fait des expériences nombreuses sur la question qui nous occupe. Il contaminait des larves de *Calliphora* avec différentes bactéries : bactéridie charbonneuse, *B. typhique*, *B. enteritidis*, *B. prodigiosus*, *Vibrion cholérique*. Il n'a pu isoler ni des larves (après lavage à l'alcool et flambage), ni des pupes, ni des mouches aucun des germes asporulés. Par contre la bactéridie charbonneuse a pu être isolée des larves ainsi que de 13 mouches sur 17 examinées. Graham-Smith en conclut que seuls les germes sporulés survivent assez longtemps pour se retrouver chez l'insecte adulte. Ici encore nous ferons remarquer qu'aucune stérilisation des pupes avant éclosion n'ayant été faite, la réinfection des mouches ne saurait être exclue. La répartition des bactéridies chez les mouches infectées semble parler en faveur de cette hypothèse ; dans aucun cas il n'a été possible de les retrouver dans le liquide émis par la mouche peu de temps après l'éclosion ; les bactéridies étaient présentes sur les pattes chez 12 mouches sur les 13 ayant donné un résultat positif.

(1) *Ibid.*
(2) *Journ. of Hyg.*, **11**, 1911.
(3) Graham-Smith, p. 116.

Krontowski (1), expérimentant sur des larves de *Sarcophaga*, de *Lucilia*, de mouche domestique, contaminées par le *B. typhique* et le bacille de Shiga, n'a jamais pu retrouver ces germes chez les mouches adultes. Tebbut (2), expérimentant avec le *Bacille dysentérique* (*type Y*) et le *Bacille typhique*, a, dans quelques expériences, stérilisé les œufs au lysol. Il n'a jamais pu retrouver le *B. typhique* chez les mouches provenant de larves ainsi contaminées ; pour ce qui est du bacille Y il a été retrouvé chez 2 mouches et chez une partie des pupes. (Ici encore nous devons appeler l'attention sur le fait que la surface des pupes n'avait pas été stérilisée avant l'éclosion des mouches.) Tebbut conclut de ses expériences que l'éventualité du passage de germes pathogènes chez l'insecte adulte doit être considérée comme fort peu probable.

Cette conclusion nous paraît, du reste, se dégager de l'ensemble des recherches que nous venons de résumer : à part, peut-être, les résultats de Bacot pour le *B. pyocyanique*, il semble bien que les germes pathogènes sur lesquels on a expérimenté ne survivent pas chez l'insecte parfait. Toutefois, celui-ci peut se réinfecter au moment de l'éclosion, ce qui nous amène à étudier les conditions de dissémination de germes par les mouches contaminées à l'état adulte. De très nombreux travaux ont été consacrés à cette question. Nous en rappellerons les plus importants.

Bacilles du groupe des typhiques et des paratyphiques. — Firth et Horocks (3) plaçaient des mouches domestiques dans une grande boîte dans laquelle ils introduisaient des cultures de *B. typhique*. Des récipients avec de la gélose et du bouillon disposés dans cette boîte ont présenté des cultures abondantes de *B. typhique*. Par contre, ces auteurs n'ont pu isoler ce bacille de taches fécales recouvrant une feuille de papier placée, à cet effet, dans la boîte. Ils concluent de leurs expériences que le *B. typhique* ne survit pas pendant son passage à travers l'intestin de la mouche et que c'est surtout sur la surface du

(1) *Centralbl. f. Bakt.*, **68**, p. 586, 1913.
(2) *Journ. of Hyg.*, **12**, p. 516, 1913.
(3) *Brit. Med. Journ.*, 1902, p. 936.

corps que cet insecte transporte les germes dont il a pu se contaminer.

Ficker (1) place des mouches domestiques sur des cultures de *B. typhique* et les transporte ensuite dans de grands flacons qu'on change tous les 2-3 jours. Il a essayé, sans succès, d'isoler le microbe contaminant en ensemençant à différents intervalles des mouches broyées : les cultures étaient envahies par d'autres bactéries et, notamment, par le *Proteus*. Ce n'est qu'en ensemençant des morceaux de papier-filtre stérilisé et exposé à la visite des mouches que Ficker a réussi à isoler le bacille typhique. Dans un cas le résultat a été positif vingt-trois jours après le repas infectant. D'autre part, en ensemençant les organes isolés, Ficker a pu isoler le *B. typhique* de la tête après un intervalle de cinq jours, de l'intestin après un intervalle de neuf jours. *Les germes isolés ont été identifiés par l'agglutination.*

Graham-Smith (2) plaçait de grandes quantités de mouches domestiques dans des cages en gaze et les nourrissait avec du sirop de sucre, additionné d'émulsion de *B. typhique*; dans ces conditions le *B. typhique* a pu être isolé pendant quarante-huit heures après le repas infectant des fèces de ces mouches et des boîtes de gélose visitées par elles; il a pu être isolé pendant cinq jours du contenu intestinal. Le *B. enteritidis* a pu être isolé pendant sept jours de l'intestin des mouches expérimentalement infectées.

De très intéressantes expériences ont été faites par cet auteur avec le virus de Danysz (3). Du pain trempé dans du lait fut exposé à diverses reprises à des mouches précédemment nourries avec des émulsions de virus. Des souris qui ont mangé de ce pain visité par les mouches quatre jours après le repas infectant contractèrent la maladie mortelle.

En dehors de ces données expérimentales sur la survivance des bactéries de ce groupe chez la mouche, nous devons citer les observations de Bertarelli (4) qui a isolé le *B. typhique* de 8 mouches sur 120 prises dans une chambre où il y avait eu

(1) *Arch. f. Hyg.*, **46**, p. 274, 1903.
(2) *Flies in relation to disease*, Cambridge, 1913, p. 130, 146.
(3) Cité d'après Hewit. *The House-fly*, Cambridge, 1914, p. 294.
(4) *Centralbl. f. Bakt.*, **53**, p. 486, 1910.

6 cas de fièvre typhoïde; de Faichnie et de Cochrane (1) qui ont pu isoler le même bacille de mouches sauvages capturées au cours de petites épidémies de typhoïde aux Indes. Tous ces auteurs ont eu soin d'identifier sérologiquement les germes isolés. Il en a été de même pour un *paratyphique B.* isolé de 2 mouches par Nicoll (2) et d'un paratyphique A isolé de 3 mouches par Porrey (3).

Bacilles dysentériques. — Auché (4) montre que des mouches nourries sur des glaires ou sur des cultures dysentériques (Flexner) ensemencent le bacille de Flexner pendant trois heures après le repas contaminant.

Kronlowski (5) retrouve le *B. dysentérique* (Shiga) pendant trois jours à la surface du corps des mouches contaminées par ce bacille; il isole celui-ci de l'intestin deux jours et des fèces trois jours après la contamination.

Vibrion cholérique. — Tsuzuki (6), Chantemesse (7), Graham-Smith (8) isolent cette bactérie de mouches contaminées. D'après ce dernier auteur, on ne retrouve le vibrion que pendant quarante-huit heures dans l'intestin, et pendant trente heures dans les fèces après le repas infectant.

B. tuberculeux. — Spillmann et Haushalter (9) ont été les premiers à attirer l'attention sur le rôle de la mouche domestique dans la dissémination du bacille tuberculeux. Ils ont constaté la présence de nombreux bacilles dans le contenu intestinal et les fèces de mouches qui avaient été nourries sur des crachats tuberculeux. Lord (10) constate que des mouches nourries sur des crachats tuberculeux éliminent de grandes quantités de bacilles avec leurs déjections. Il a compté 2 à

(1) Cité d'après Graham-Smith, p. 130.
(2) *Journ. of Hyg.*, **11**, p. 381, 1912.
(3) *Journ. Inf. Diseas.*, **10**, p. 166, 1912.
(4) *C. R. Soc. Biol.*, **2**, 1906, p. 450.
(5) *Centralbl. f. Bakt.*, **68**, 1913, p. 586.
(6) Cité d'après Graham-Smith, p. 173.
(7) Chantemesse et Borel, *Mouches et choléra*, Paris, Baillière, 1906.
(8) P. 173.
(9) *C. R. Acad. Sciences*, **105**, 1887.
(10) *Flies and Tuberculosis*, *Boston Med. Journ.*, 1904, p. 651, d'après Graham-Smith.

3 000 bacilles par tache fécale. Les bacilles contenus dans ces taches se sont montrés virulents pour le cobaye quinze jours après l'émission des fèces; ils ne l'étaient plus vingt-huit jours plus tard. Graham-Smith (1) nourrissait des mouches sur des cultures pures de bacille tuberculeux ainsi que sur des crachats. Dans le premier cas, les bacilles se retrouvent en grand nombre dans l'intestin pendant six jours; dans certains cas, on peut retrouver des bacilles isolés pendant douze jours et même plus. Lorsque les mouches sont nourries sur des crachats tuberculeux, on retrouve le bacille de Koch pendant quatre jours dans l'intestin et les fèces.

Bacille de la lèpre. — Wherry (2), expérimentant avec le bacille de Stefansky, retrouve ce microbe dans les fèces de mouches nourries avec de la matière infectée. Lebœuf (3), examinant le contenu intestinal et les déjections de mouches qui s'étaient gorgées sur des ulcères lépreux, constate la présence du bacille de Hansen en grand nombre trente-six heures après le repas infectant. Currie (4) retrouve les bacilles lépreux pendant quatre jours dans l'intestin de mouches domestiques. Marchoux (5) nourrit des mouches sur de la pulpe ganglionnaire riche en bacilles de Stefansky. Des rats blancs, chez lesquels on a pratiqué une boutonnière de un centimètre sur le dos, sont exposés à la visite de ces mouches. On constate, dans ces conditions, que l'infection par contact ne se produit que pendant un temps très court, les bacilles qui se trouvent à la surface du corps succombant très vite à la dessiccation. Ils restent vivants pendant quatre jours au moins dans l'intestin ainsi que le montre l'inoculation du contenu.

B. diphtérique. — Les expériences de Nuttall et Graham-Smith (6) semblent montrer que cette bactérie ne survit que quelques heures à la surface du corps des mouches; elle résisterait vingt-quatre heures dans le contenu intestinal. Les

(1) Graham-Smith, p. 177.
(2) *Journ. Inf. Diseas.*, **5**, p. 507, 1908.
(3) *Bull. Soc. Pathol. exot.*, **5**, p. 860, 1912.
(4) Cité d'après Marchoux. Ces *Annales*, **30**, p. 81, 1916.
(5) Ces *Annales*, **30**, p. 81, 1916.
(6) Graham-Smith, p. 186.

auteurs ajoutent, du reste, que l'isolement du bacille diphtérique n'a souvent pu être fait par suite de l'envahissement des cultures par des germes banaux, ce qui fausse les résultats des expériences.

B. CHARBONNEUSE. — Nous ne nous arrêterons pas aux recherches de Celli, de Sangrée, de Buchanan, qui n'ajoutent rien aux résultats de Raimbert et de Davaine mentionnés plus haut. Graham-Smith (1) reprend la question en étudiant le transport par les mouches de la bactéridie asporulée, telle qu'elle se trouve dans l'organisme animal, et des bacilles sporulés. Dans le premier cas, les mouches étaient nourries sur le cadavre d'une souris morte d'infection charbonneuse. Tous les jours un certain nombre de mouches étaient sacrifiées, leurs organes et le contenu intestinal ensemencés. Ces expériences montrent que la bactéridie ne survit guère plus de vingt-quatre heures sur la surface du corps, alors qu'on peut la retrouver vivante pendant trois jours dans le contenu intestinal et même pendant cinq jours dans celui du jabot, lorsque celui-ci contient du sang. Pour ce qui est des bactéridies sporulées, elles survivraient, d'après Graham-Smith, pendant vingt jours et plus sur la surface du corps et dans le contenu intestinal.

Il résulte de l'ensemble des recherches que nous venons d'exposer que les mouches contaminées par des germes pathogènes peuvent les véhiculer pendant un temps plus ou moins long et, par conséquent, contribuer à la propagation des maladies correspondantes. L'importance du rôle des mouches dépendra, évidemment, de la nature des germes, de la porte d'entrée de l'infection. Pour une même infection elle variera avec le climat, la facilité d'accès aux matières infectieuses (conditions hygiéniques), etc. Les observations de Niven (2) sur la diarrhée infantile ; celles de Faichnie, de Cochrane, de Ainsworth (3) sur la fièvre typhoïde ; celles de Chantemesse sur le choléra ; celles de Lauber (4) sur la dysenterie bacillaire, semblent montrer que, dans les infections d'origine intestinale,

(1) Graham-Smith, p. 181.
(2) *Proc. Roy. Soc. med.*, p. 131.
(3) D'après Graham-Smith, p. 131.
(4) *Centralbl. f. Bakt.*, **84**, p. 201, 1920.

le rôle des mouches peut être considérable ou même prépondérant. Il serait donc important de préciser les conditions de transport par les mouches des agents de ce groupe d'affections. Or, de telles recherches se heurtent à de grosses difficultés du fait de la richesse de la flore normale de la mouche. Cox, Lewis et Glynn (1) ont montré, par des expériences soigneuses, que le nombre de germes transportés par une mouche peut s'élever à plusieurs centaines de millions. L'isolement d'un germe quelconque devient, dans ces conditions, aléatoire. La difficulté devient presque insurmontable dans le cas des germes qui nous occupent plus spécialement : le *B. typhique*, les *paratyphiques*, les *bacilles dysentériques*. Ainsi que l'ont vu Ledingham et Graham-Smith, et que nous avons pu le constater nous-même, la flore normale de la mouche est constituée, pour une grande part, de bactéries qui ne se différencient de ces germes ni par la morphologie, ni par l'aspect des colonies, ni par les caractères biochimiques ; seules les réactions sérologiques permettent de se prononcer sur leur nature. On conçoit qu'il soit impossible, dans ces conditions, d'affirmer, même après examen de très nombreuses colonies, l'absence de la bactérie cherchée. On a voulu tourner la difficulté en employant des bactéries chromogènes, facilement décelables ; mais il va de soi que les résultats obtenus avec ces micro-organismes ne sauraient être étendus, sans preuves, aux germes pathogènes qui nous occupent.

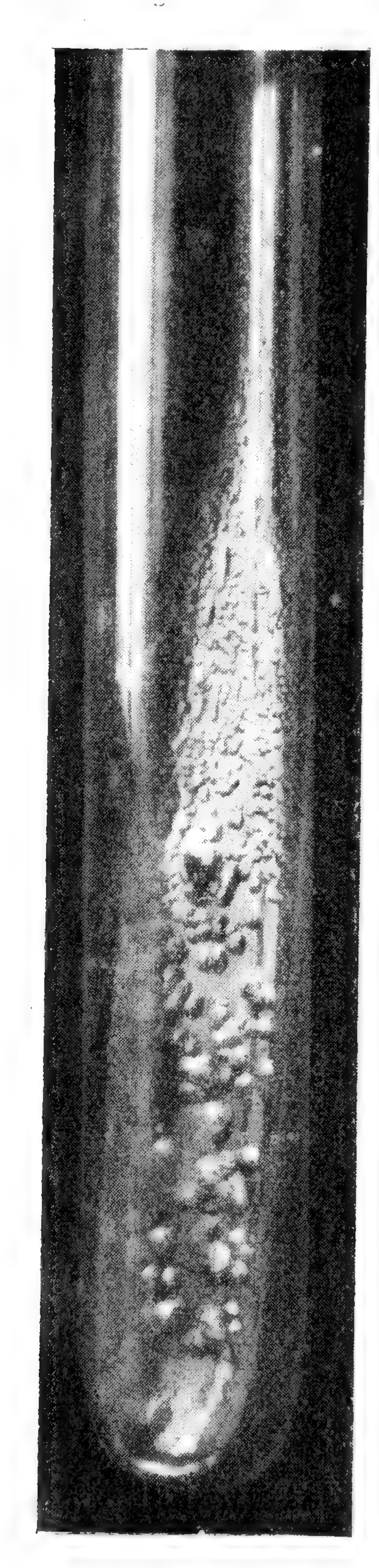


Fig. 1. — Culture pure de *B. Shiga* ensemencée par une mouche domestique dans un tube de gélose inclinée.

Pour toutes ces raisons, il nous a semblé intéressant de reprendre l'étude du transport des germes

(1) *Journ. of Hyg.*, **12**, p. 290, 1912.

MASSON ET CIE, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120 — PARIS — VIe ARR.

NUMÉRO 97

JUIN 1921

DERNIÈRES PUBLICATIONS MÉDICALES

Chirurgie d'Urgence

par **Félix LEJARS**

Professeur de clinique chirurgicale à la Faculté de Médecine de Paris,
Chirurgien de l'hôpital Saint-Antoine.

Un volume grand in-8 de 1120 pages avec 1100 figures et 20 planches hors texte en deux tons.
Broché sous couverture forte. . . . . **75** fr. net.
Edit. de luxe, *rel. en deux vol.*, toile pleine, fers spéciaux et tirée sur beau papier couché. **90** fr. net.

C'est la *huitième édition* du *Traité de Chirurgie d'Urgence* qui reparaît en librairie; à ces nombreuses éditions il convient d'en ajouter six en langues étrangères, souvent rééditées d'ailleurs. En raison des ... les dernières

Tous les chapitres de cette huitième édition ont été revus, élagués, précisés, d'après l'expérience acquise et les données nouvelles. L'auteur applique à la chirurgie du temps de paix les enseignements de la guerre, en particulier pour le *traitement des plaies* ... *plaies des parties molles*, — *des grands*

... ouvrage cesse d'être vivant, vécu et écrit pour « servir ».

... unique, cette nouvelle édition analyse et expose d'un point de vue hautement critique TOUT ce qu'un médecin doit savoir de la chirurgie.

Thérapeutique Clinique

par le Dr A. MARTINET

Avec la collaboration de MM. **Desfosses, G. Laurens, Léon Meunier, Lomon, Lutier, Martingay, Mougeot et Saint-Cène.**

Deux volumes grand in-8° formant ensemble 1340 pages avec 312 figures dans le texte et de nombreux tableaux . . . . Prix. . . **70** fr. net.

Ce volume est le complément logique et nécessaire du « *Diagnostic clinique* » du Dr Martinet. Il a été conçu dans le même esprit « pragmatique » réalisé typographiquement, dans des conditions identiques. Les deux volumes ne constituent, à proprement parler, qu'une même œuvre : un manuel de pratique médicale d'un plan essentiellement nouveau, adéquat aux exigences cliniques. — La méthode générale d'exposition est la même dans les deux ouvrages, et constitue une synthèse entre les nécessités de l'exposé scientifique et l'aspect concret que présentent les cas particuliers que rencontre la pratique.

La première partie de l'ouvrage : *Agents thérapeutiques*, apprend à connaître les armes chimiques alimentaires, physiques, psychiques dont le thérapeute dispose dans sa lutte contre la maladie.

La thérapeutique actuelle exige la mise en œuvre de *Techniques thérapeutiques*, chaque jour plus nombreuses, qui font l'objet de la *deuxième partie*.

La troisième partie : *Thérapeutique des symptômes*, s'apparente plus étroitement encore au *Diagnostic clinique*. Les symptômes morbides, classés par ordre alphabétique, sont successivement étudiés, et pour chacun d'eux tous les traitements sont exposés dans les détails les plus minutieux.

La quatrième partie enfin est consacrée à la *Thérapeutique des maladies*. Le Dr Martinet y donne un exposé clair, succinct et substantiel de l'état actuel de la thérapeutique propre à chaque maladie.

Sur demande, la Librairie Masson et Cie envoie gratuitement son **CATALOGUE GÉNÉRAL** *avec* **table analytique des matières et des auteurs classés par ordre alphabétique** *et ses bulletins de* **Nouveautés** *publiés périodiquement.*

Les ouvrages édités par la *Librairie Masson et Cie* sont en vente chez tous les libraires. — Les commandes qui sont adressées directement à la *Librairie Masson et Cie*, accompagnées du montant de leur valeur augmenté de 10 % pour frais de port et d'emballage, sont exécutées sans délai.

pathogènes par les mouches, par la méthode des élevages aseptiques. En l'absence de microbes autres que ceux intro-



Fig. 2. — Culture pure de *B. typhique* ensemencée par une *Calliphora* sur gélose lactosée tournesolée contenue dans une boîte de Roux.

duits par l'expérience, les résultats sont d'une netteté et d'une précision très grandes. On peut, en effet, recourir aux épreuves les plus rigoureuses, telles que l'ensemencement en milieu

liquide. Dans tous les cas, la présence du germe cherché est révélée par une culture pure [voir figures 1, 2, 3 (1)]; en son absence le milieu reste stérile. On peut également recourir à l'inoculation intrapéritonéale, intraveineuse, intraoculaire.

Enfin, chez les mouches aseptiques, les germes sont soustraits à la concurrence des bactéries normales. Les durées de survie observées peuvent donc être considérées comme des *durées limites* et nous guider dans la pratique, pour les mesures à prendre (2).

Nous avons vu plus haut que, dans la nature, la contamination des mouches pouvait se produire au stade larvaire ou à celui d'insecte parfait. Dans le premier cas, il faut établir le sort des germes ingérés par les larves. Dans le deuxième, le temps pendant lequel les insectes contaminés restent porteurs de germes. De là, deux séries d'expériences.

I. — Contamination au stade larvaire. Sort des germes ingérés par les larves.

Les expériences de cette première série ont porté sur les larves de la mouche à viande (*Calliphora vomitoria*), celles de la mouche verte (*Lucilia cesar*) et celles de la mouche domestique. Toutes ces mouches peuvent, en effet, déposer leurs œufs, entre autres, sur des cadavres ou les déjections humaines (Howard). Les larves peuvent, par conséquent, dès leur éclosion, se trouver en contact avec des bactéries pathogènes.

Voici, brièvement, la technique employée (3).

L'amas d'œufs est dissocié sur une petite nappe de coton de verre, qu'on roule et qu'on introduit dans un tube spécial dans lequel on fait arriver, alternativement, du sublimé à 1 p. 2.000 et de l'eau stérile, les œufs étant soumis à l'action du sublimé pendant cinq à six minutes en tout. Après un dernier lavage à l'eau stérile, la nappe de coton de verre est étalée dans une boîte de Petri stérile et les œufs sont trans-

(1) Photographies faites par M. Jeantet.

(2) Etant données les conditions dans lesquelles les germes introduits sont éliminés (voir plus loin), il ne semble pas qu'il y ait lieu de tenir compte des bactéries favorisantes.

(3) Ces *Annales*, **25**, 79, 1911.

portés, un à un, ou par plusieurs, dans les tubes renfermant la nourriture des larves. Cette nourriture est constituée par de la cervelle stérilisée dans le cas des larves de *Lucilia* ou de *Calliphora* (1), par du crottin de cheval stérilisé pour les larves de la mouche domestique. Après éclosion des larves et vérification



Fig. 3. — Une partie de la même culture montrant les traces laissées par les ailes mouillées de la mouche.

de la stérilité, on introduisait dans les tubes contenant les larves les émulsions des microbes pathogènes à étudier. Les expériences ont porté sur le *B. typhique*, le *B. dysentérique* (*Shiga*), le *B. tuberculeux* et la *bactéridie charbonneuse*. Dans la pratique c'est, en effet, la contamination par les bacilles du groupe du *typhique*, des *paratyphiques*, des *dysentériques* qui doit se réaliser le plus souvent, les larves pouvant rencontrer

(1) *C. R. Soc. Biol.*, **82**, 593, 1919.

ces germes dans les déjections de malades ou des porteurs. Le bacille tuberculeux peut, lui aussi, être éliminé en quantités considérables avec les déjections (1), Enfin, la bactéridie charbonneuse, microbe sporulé, peut se rencontrer, dans la nature, dans les habitats de larves de muscidés.

Après transformation des larves, le microbe contaminant était recherché dans les pupes et chez les insectes parfaits. Dans le premier cas, on flambait une extrémité de la pupe, on la faisait sauter avec un ciseau stérile et on prélevait le contenu avec une pipette Pasteur. Dans le second, les mouches étaient recueillies sur des milieux nutritifs solides ou liquides; dans une partie des cas les pupes étaient stérilisées au sublimé avant l'éclosion des mouches.

1° Expériences avec le *B. typhique*.

a) Larves de *Calliphora* écloses le 22 juillet; *B. typhique* ajouté le lendemain; pupes formées du 1er au 5 août.

Le contenu de deux pupes non écloses est ensemencé le 29 septembre ; on trouve du *B. typhique abondant en culture pure.*

L'intestin d'une mouche morte peu de temps après l'éclosion est ensemencé : *culture abondante de B. typhique.*

b) Larves de *Calliphora* écloses le 31 août; *B. typhique* ajouté le 3 septembre, deux pupes formées le 10; une de ces pupes est lavée au sublimé, l'autre transportée dans un tube stérile sans désinfection préalable. Cette dernière donne une mouche le 19; le 22 on transporte celle-ci dans une boîte de Roux contenant de la gélose lactosée tournesolée. Au bout de quelques heures, la mouche se noie dans l'eau de condensation. La boîte de Roux, mise à l'étuve, montre de nombreuses colonies de *B. typhique.*

La pupe lavée au sublimé ne donne pas de mouche; le contenu est ensemencé le 28 septembre et donne une abondante culture de *B. typhique.*

c) Larves de *Lucilia* écloses le 5 août; *B. typhique* ajouté le 10; contenu d'une pupe ensemencée le 30 : *B. typhique.* Mouche éclose le 11 septembre est mise sur gélose lactosée tournesolée le 22 : *B. typhique abondant.*

d) Larves de mouche domestique écloses le 7 octobre; *B. typhique* ajouté le 8; pupes à partir du 14; trois pupes lavées au sublimé; mouches écloses le 25; elles sont transportées sur gélose : *celle-ci reste stérile.* Le 27, deux de ces mouches sont recueillies dans un tube de bouillon : celui-ci reste stérile. Une mouche provenant d'une pupe non lavée au sublimé est recueillie, aussitôt l'éclosion, sur gélose inclinée. Celle-ci reste stérile.

2° Expériences avec le *B. dysentérique* (Shiga).

a) Larves de *Lucilia* du 5 août; ajouté *B. Shiga* le 10. Une mouche éclose le 31 est portée aussitôt sur gélose lactosée tournesolée; la gélose reste stérile.

(1) CALMETTE. Ces *Annales*, **33**, p. 61, 1919.

b) Larves de *Calliphora* écloses le 31 août; ajouté du *B. Shiga* le 3 septembre. Une mouche éclôt le 23; les déjections ensemencées *se montrent stériles*; mise le 24 sur gélose; *celle-ci reste stérile.* L'intestin de cette mouche est retiré et ensemencé le 28; *la gélose reste stérile.* Une autre mouche éclôt le 24; *les déjections sont stériles*; l'intestin est enlevé et ensemencé le 28 : *il est stérile.* Une mouche éclôt le 26. Une gouttelette de liquide regurgité est ensemencée : *B. dysentérique en culture pure.* L'intestin de cette mouche est enlevé et ensemencé sur gélose inclinée : *culture abondante de Shiga.* La pupe ayant donné naissance à cette mouche est écrasée et ensemencée sur gélose inclinée le 29 : *culture abondante de Shiga.*

Le contenu de deux pupes provenant des larves du 31 août et celui d'une pupe du 23 est ensemencé le 28 : *toutes les trois donnent une culture abondante de Shiga.*

c) Quatre larves de mouche domestique écloses le 7 octobre sont contaminées avec du Shiga le 8. Les pupes sont stérilisées au sublimé. Les mouches éclosent le 26 et sont mises sur gélose pendant deux heures : *la gélose reste stérile.* Il en est de même de deux mouches provenant de pupes non stérilisées au préalable : mises sur gélose aussitôt après l'éclosion *le milieu reste stérile.*

3° Expériences avec la *bactéridie charbonneuse*.

14 décembre, éclosion d'une mouche provenant d'une larve contaminée de bactéridies filamenteuses et sporulées et dont la pupe a été stérilisée au sublimé. Mise sur gélose *elle laisse le milieu stérile.* Recueillie ensuite dans du bouillon celui-ci reste également stérile. 7 janvier, éclosion de deux mouches provenant de larves contaminées de bactéridies et dont les pupes ont été stérilisées au sublimé. Les deux mouches sont aussitôt mises sur gélose : *le milieu reste stérile.*

4° Expériences avec le *B. tuberculeux*.

Larves de *Calliphora* écloses le 1er septembre sont contaminées de B. tuberculeux bovin le 3. On trouve deux pupes le 10. Une de ces pupes est stérilisée au sublimé. La pupe non stérilisée donne naissance à une mouche le 19. Celle-ci est tuée le 24 et broyée dans un peu d'eau stérile. Le produit du broyage est inoculé dans la chambre antérieure de l'œil droit du lapin **38** *M.* et sous la peau du cobaye **37** *M.* La pupe stérilisée au sublimé donne naissance à une mouche le 24; celle-ci est aussitôt broyée et injectée au cobaye **36** *M.* Aucun de ces trois animaux n'a présenté d'accident tuberculeux : observation pendant deux mois et autopsie.

Les expériences que nous venons de décrire montrent que les germes pathogènes employés ne passent pas de la larve à l'insecte parfait. La stérilité absolue a, en effet, été observée chaque fois que les pupes avaient été au préalable, désinfectées au sublimé. Il en a été de même pour la plus grande partie des pupes qui n'avaient pas été stérilisées. Dans une partie des cas les mouches provenant de celles-ci ont donné des cultures du microbe contaminant : il y a eu réinfection au contact de la

pupe. En effet, dans tous les cas, l'ensemencement des pupes, soit avant, soit après l'éclosion des mouches, a donné des cultures des germes employés (expériences faites avec le *B. typhique* et le *B. dysentérique*). Cette réinfection semblait se produire plus facilement pour les pupes de *Calliphora* et de *Lucilia* que pour celles de la mouche domestique : la surface des premières est couverte d'une couche gluante provenant de la digestion de la cervelle, alors que la surface des pupes formées dans le crottin est tout à fait nette et sèche.

La non-persistance des bactéries pathogènes étudiées chez l'insecte parfait ne s'explique pas, comme le pense Graham-Smith, par le fait que celles-ci ne vivent pas assez longtemps à l'intérieur des pupes : dans les cas où la métamorphose ne s'achève pas, le contenu de celles-ci donne une culture abondante, après des intervalles très longs (deux mois). La disparition des bactéries semble être en relation avec les processus qui se déroulent pendant la métamorphose (1). La dernière mue débarrasse la larve, mécaniquement, des germes fixés sur la surface du corps. Il en est de même des microbes qui se trouvent dans l'intestin : exuviation de l'épithélium de l'intestin moyen, détachement du revêtement chitineux de l'intestin antérieur. Enfin, les germes qui n'ont pas été expulsés mécaniquement, ceux, notamment, qui se trouvent dans l'intestin postérieur sont probablement détruits par phagocytose, en même temps que le revêtement épithélial de cette partie du tube digestif.

Ces résultats (2) sur la disparition chez l'insecte adulte des bactéries pathogènes ingérées par les larves sont en complet accord avec ceux de Tebbut, de Ledingham, de Krontowski et, en très grande partie, avec ceux de Graham-Smith. Toutefois, ce dernier auteur admet le passage, dans une partie des cas, de la bactéridie charbonneuse. Il a, en effet, retrouvé ce bacille

(1) Pérez, Recherches histologiques sur la métamorphose des muscidés. *Arch. de Zool. expérim.*, **44**, 1910.

(2) Il ne semble pas qu'on puisse étendre les résultats obtenus à toutes les bactéries. Certains microbes de la flore normale de la mouche peuvent passer de la larve à l'insecte parfait. Il ne nous a été possible d'obtenir qu'une faible proportion de mouches aseptiques en stérilisant la surface des pupes ordinaires. Il semble en être de même pour le bacille pyocyanique (expériences de Bacot).

sporulé dans treize mouches sur dix-sept examinées. Pourtant, dans ces cas, la réinfection par la surface de la pupe nous paraît probable. Il n'est fait aucune mention de la stérilisation de celles-ci ; d'autre part, la bactéridie était absente des matières blanchâtres expulsées par les mouches aussitôt après l'éclosion, et se retrouvait, par contre, sur les pattes, chez douze mouches sur treize.

Par contre, nos résultats sont en désaccord avec ceux de Faichnie. Or, dans les expériences de cet auteur, aucune précaution n'a été prise pour éviter la réinfection des mouches par les déjections typhiques (ou paratyphiques) sur lesquelles les larves s'étaient développées.

II. — Transport des germes pathogènes par les mouches adultes.

Les expériences de cette série ont porté sur la mouche domestique. C'est, en effet, cette espèce surtout qui entre en ligne de compte, à l'état d'insecte parfait, comme véhicule de germes pathogènes pour l'homme.

Les mouches étaient mises sur culture pure du microbe à étudier (culture sur gélose pour les bacilles typhique et dysentérique, la bactéridie charbonneuse ; culture sur milieu liquide de Besredka pour le bacille tuberculeux). On les recueillait ensuite dans de petits ballons contenant du coton hydrophile imbibé d'un peu de lait et d'eau (1). La présence ou l'absence du germe cherché étaient constatées en faisant passer les mouches à différents intervalles, sur milieu nutritif, gélose ou bouillon (par inoculation, pour le *B. tuberculeux*).

Expériences avec le *B. typhique*.

17 octobre. Une mouche est mise sur culture de *B. typhique*. L'intestin de cette mouche est enlevé le 20 et ensemencé : culture abondante de *B. typhique*.

26 octobre. Une mouche est mise sur culture de *B. typhique* pendant deux heures; mise sur gélose le 27 : culture abondante de *B. typhique*; remise sur

(1) Pour le transport des mouches aseptiques d'un récipient à l'autre, on se sert de leur phototropisme positif très prononcé : le tube ou le goulot du ballon contenant les mouches est flambé et introduit dans le goulot du récipient dans lequel on veut les transporter. On dirige ensuite celui-ci vers la lumière en chauffant lé èrement le récipient qui contient les mouches.

gélose le 30 : *B. typhique*; remise sur gélose le 4 novembre; *B. typhique*, le 10 la mouche meurt; ensemencée sur gélose inclinée elle donne une culture abondante de *B. typhique.*

2 novembre. Deux mouches mises sur culture de *B. typhique* pendant deux heures. Mises sur gélose inclinée le 5, elles donnent toutes les deux des cultures abondantes de *B. typhique.* A partir du 5, l'une de ces mouches est transportée tous les deux jours dans un ballon stérile; remise sur gélose inclinée le 19, *la mouche se montre stérile*; recueillie dans du bouillon le 20, *le bouillon reste définitivement stérile.* L'autre mouche est remise sur gélose le 17 et le 24, et *donne chaque fois une culture abondante de B. typhique.*

30 octobre. Mouche mise sur culture de *B. typhique*; mise sur gélose le 9 novembre ; culture abondante de *B. typhique.*

4 novembre. Mouche mise sur culture de *B. typhique*; mise sur gélose le 23, celle-ci reste stérile ; il en est de même le 24; mise dans du bouillon le 4 décembre, *le bouillon reste stérile.*

10 novembre. Deux mouches sont mises sur une culture de *B. typhique*; elles sont ensuite transportées dans des ballons neufs tous les deux jours. Mises sur gélose inclinée le 20, *celle-ci reste stérile.*

Expériences avec le *B. dysentérique* (Shiga).

13 octobre. Une mouche est mise sur culture de *B. Shiga.* Mise sur gélose le 21, pendant trois heures, *la gélose reste stérile.*

29 octobre. Une mouche est mise sur culture de *Shiga.* Mise sur gélose le 30; culture abondante de *B. Shiga.* Les excréments de cette mouche sont ensemencés le 3 novembre et donnent une culture abondante de *B. Shiga.* Il en est de même du liquide régurgité. Remise sur gélose inclinée le 5; *culture abondante de Shiga*, idem le 10.

2 novembre. Quatre mouches sont mises sur une culture de *Shiga* pendant deux heures; le 5 une de ces mouches est mise sur gélose : une colonie de *Shiga.* Recueillie dans un ballon neuf et remise sur gélose le 17, la gélose reste stérile; il en est de même le 23 et le 26. Les trois autres mouches de cette expérience sont changées de ballon tous les deux jours; elles sont mises sur gélose le 17 : *la gélose reste stérile*; idem le 19; recueillies dans du bouillon le 20, *le bouillon reste stérile.*

Expériences avec la *bactéridie charbonneuse.*

2 décembre. Deux mouches sont contaminées de charbon sporulé; mises sur gélose le 4, elles donnent une culture abondante de bactéridies. Elles sont ensuite passées dans des ballons neufs tous les deux jours et remises sur gélose le 14; *la gélose reste stérile.* Les mouches sont recueillies dans du bouillon le 15: *le bouillon reste stérile.*

Expériences avec le *B. tuberculeux.*

Une seule expérience a été faite. Deux mouches ont été mises le 3 novembre dans un ballon contenant du coton imbibé de culture, en milieu de Besredka, de B. tuberculeux bovin. Le 5, elles sont transportées dans un ballon contenant du lait et de l'eau. Le 9, les mouches sont broyées dans 1 cmc 5 d'eau physiologique, 0 cmc 25 de cette émulsion est injecté dans la chambre antérieure de l'œil droit du lapin **43** *F.* Le 23 décembre, ce lapin ne présente rien d'anormal.

On voit, par ces expériences, que les mouches domestiques contaminées par certains germes pathogènes (le *B. typhique* et le *B. de Shiga*, notamment) et gardées ensuite dans des ballons, peuvent rester infectantes pendant des périodes assez longues (vingt-deux jours dans une des expériences). Toutefois, lorsqu'on se rapproche davantage des conditions réalisées dans la pratique, en transportant les mouches, à intervalles rapprochés, dans des récipients neufs, *elles se débarrassent rapidement* (*en* 8-10 *jours*) *des germes infectants*. Cette *auto-stérilisation* paraît être le résultat de facteurs purement mécaniques: les bactéries éliminées avec les déjections et le liquide régurgité sont, en effet, parfaitement vivantes, et d'autre part, la stérilisation se produit pour des formes aussi résistantes que le charbon sporulé.

On tiendra utilement compte de ces faits, lorsqu'il s'agira de fixer le rôle des mouches dans la dissémination des divers agents pathogènes. Là où ce rôle semble être établi, la notion de l'*auto-stérilisation* des mouches permettra de préciser les mesures prophylactiques.

SUR UN MICROBE PATHOGÈNE ISOLÉ AU COURS D'UNE FIÈVRE DE CAUSE INCONNUE EN COCHINCHINE

(ÉTUDE CLINIQUE ET EXPÉRIMENTALE)

par P. Noel BERNARD.

INTRODUCTION

L'étude expérimentale qui fait l'objet de ce travail a pour point de départ l'isolement d'un microbe pathogène, dans le sang de l'homme, au cours de recherches faites à Saïgon sur les fièvres de causes indéterminées.

Ces fièvres, dites climatiques, sont désignées en Indochine sous le nom de « pseudo-dengue des mers de Chine et des Philippines », « fièvre des cinq jours », « fièvres des sept jours », « fièvre des ports de l'Inde et de la Chine ».

Ce microbe, auquel la production d'une spore confère une résistance considérable dans le milieu extérieur, est très répandu dans la nature.

Le fait qu'il est isolé du sang de l'homme dans certains états fébriles ne suffit à prouver ni son rôle pathogène ni sa spécificité. Il pourrait être considéré, soit comme un germe associé à un germe pathogène inconnu, filtrant ou non filtrant, soit comme un microbe saprophyte susceptible d'apparaître dans des états pathologiques divers.

Mais il produit, chez le porcelet, une maladie expérimentale toxi-infectieuse, transmissible par les aliments, à point de départ gastro-intestinal, qui ne saurait être confondue avec aucun autre état pathologique connu de cet animal. Cette maladie présente des formes bénignes et moyennes remarquables par leurs symptômes nerveux et gastro-intestinaux et superposables à la maladie humaine. Dans ces formes graves,

elle entraîne tantôt la mort, tantôt la guérison accompagnée de séquelles d'atrophie musculaire incurables et progressives.

Ce premier mémoire ne tend à affirmer ni l'existence d'un agent pathogène correspondant à une maladie climatique antérieurement définie par la clinique, ni la spécificité du microbe isolé vis-à-vis de la maladie humaine décrite. Ces questions ne sont pas définitivement résolues. La conclusion reste subordonnée à une étude plus prolongée et plus étendue.

Cet exposé (1) se borne à présenter les caractères du microbe, les symptômes de la maladie au cours de laquelle il a été isolé, les données fournies par l'expérimentation sur les animaux, et la discussion des résultats obtenus.

PREMIÈRE PARTIE

CARACTÈRES DU MICROBE

A. — Morphologie

Le microbe se présente au microscope, à l'état frais, sous plusieurs aspects différents. Dans aucun cas il n'a été possible de l'observer par examen direct du sang des malades ou des animaux en expérience.

On le retrouve aisément dans les frottis d'organes des animaux infectés, toujours sous la forme bacillaire. Dans les cultures, il apparaît sous ses divers états : 1° bâtonnet mobile ou bâtonnet immobile, en chaînettes, clair en son milieu, les deux extrémités plus sombres, en forme de navette ; 2° longs filaments flexueux, onduleux, souvent enchevêtrés ; 3° spores ovoïdes.

(1) Ce travail a pu être poursuivi grâce au concours du Dr Lalung Bonnaire, directeur de l'hôpital indigène de Cochinchine, qui a collaboré quotidiennement à la sélection et à l'observation des malades, du Dr Ledoux, directeur de l'hôpital de Choquan, qui m'a donné les plus grandes facilités de recherches, des Drs Roton, Marque, médecins traitants de l'hôpital militaire de Saïgon, du Dr G. Montel, médecin de la clinique municipale de Saïgon, des Drs Flèche et Goeré, médecins de la marine, MM. Lu et Cuong, médecins annamites en service dans les hôpitaux de Choquan et Cholon.

Le Dr Bablet, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Saïgon, a bien voulu assurer le travail très considérable des recherches anatomo-pathologiques.

M. Lelouet, chef du service vétérinaire à l'Institut Pasteur de Saïgon, m'a apporté l'aide de sa grande expérience des maladies animales en Indochine.

1° Forme bacillaire. — Sous sa forme bacillaire (fig. 1), c'est un bâtonnet droit, à bouts arrondis, flexible, homogène, se déplaçant avec une allure tortueuse et exécutant des mouvements de pirouette. Tantôt libre, tantôt en chaînettes de deux ou trois articles.

Après quelques heures de culture, les bâtonnets s'immobilisent. Ils paraissent clairs en leur milieu, les deux extrémités plus sombres. L'espace clair correspond à la spore médiane

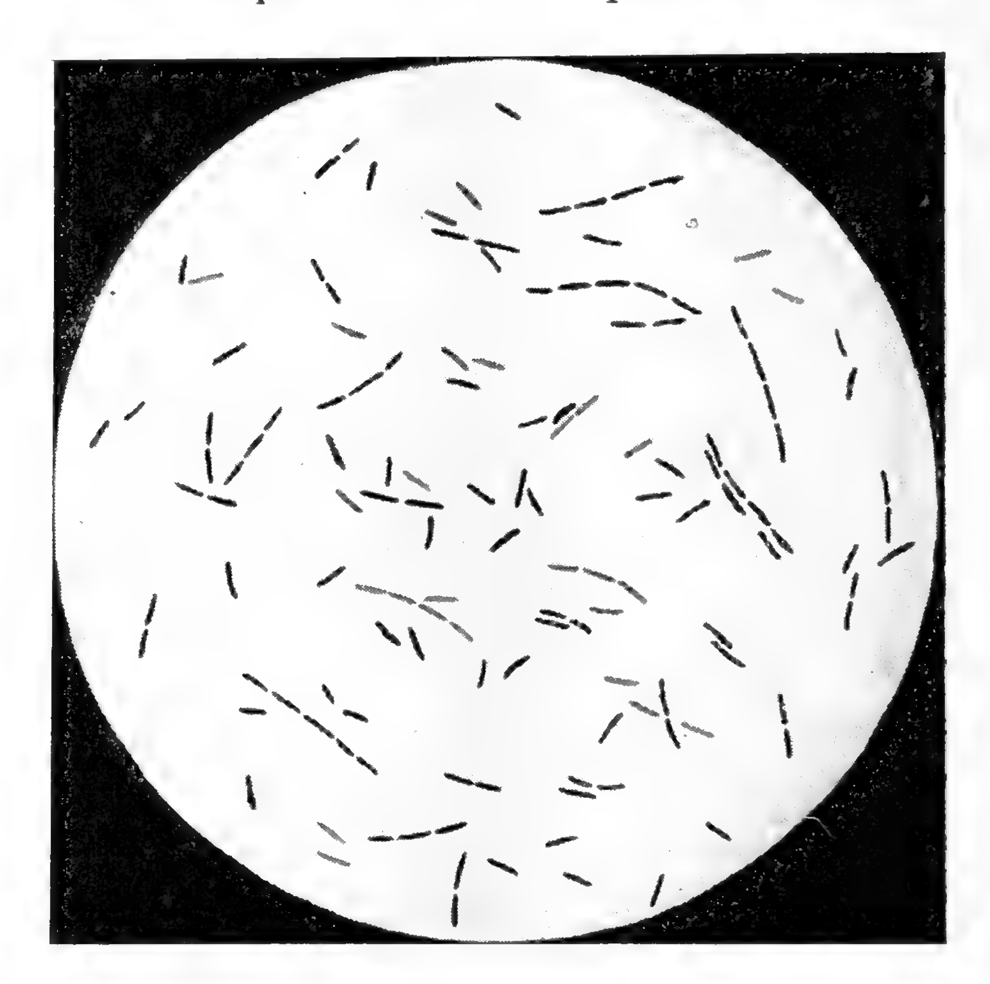


Fig. 1. — Culture de douze heures en bouillon.

en formation. Dans les tissus vivants, le parasite ne donne jamais de spores et se reproduit exclusivement par scissiparité.

Coloration. — Il se colore par toutes les couleurs basiques d'aniline, plus nettement avec la fuschine phéniquée diluée. Il prend le Gram, qui constitue le colorant de choix.

Après coloration, il a l'aspect d'un bâtonnet à bouts arrondis. Provenant d'une culture sur gélose de six à dix-huit heures et coloré par le Gram, il mesure de 3 μ. 5 à 4 μ de longueur sur 1 μ. 5 de largeur. En voie de sporulation, il se présente sous la forme d'une navette, les deux extrémités fortement colorées, la partie médiane incolore.

2° Forme filamenteuse. — Dans les cultures, et en particulier dans les cultures en bouillon, après vingt-quatre heures, apparaissent des chaînettes de bacilles, filaments très longs, flexueux, souvent enchevêtrés comme des écheveaux de fil. Ils sont immobiles. La coloration est la même que pour la forme bacillaire.

3° Spores. — Avec une rapidité variable suivant le milieu de culture on voit, peu d'heures après l'ensemencement, apparaître au centre du bâtonnet un espace ovoïde réfringent qui contraste nettement avec les bouts nettement colorés (fig. 2). C'est la spore en formation. Bientôt le protoplasma se désagrège en fines granulations et la spore ovoïde est mise en liberté (fig. 3). Elle mesure alors 2 μ 5 de long sur 1 μ de large. Dans les cultures vieilles de plusieurs jours, on constate sur les longs filaments que tous les bâtonnets ne donnent pas de spores. Un certain nombre de spores germent, ce qui permet d'observer sur une même préparation toutes les formes d'évolution du microbe.

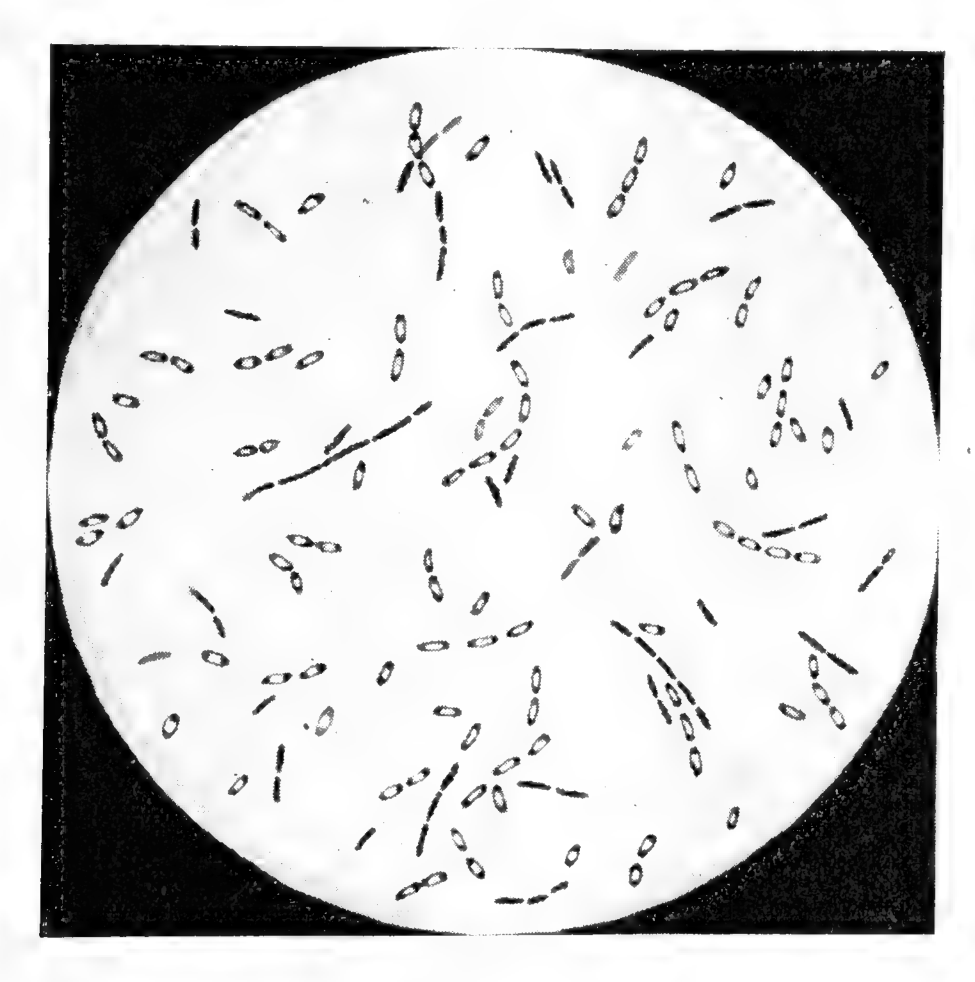


Fig. 2. — Culture de trente-six heures en bouillon; formation des spores.

Les spores se colorent bien par le Ziehl-bleu de méthylène, en employant l'alcool absolu comme décolorant.

4° Cils. — Chaque bâtonnet possède 8 à 16 cils flexueux (fig. 4) de 8 à 10 μ de longueur, présentant plusieurs ondulations. Les cils sont répandus sur toute la surface du corps microbien.

5° Forme d'involution. — Dans les hémocultures, en présence du sérum d'animaux préparés, le parasite présente des formes involutives. Les bâtonnets s'amincissent, s'effritent, prennent

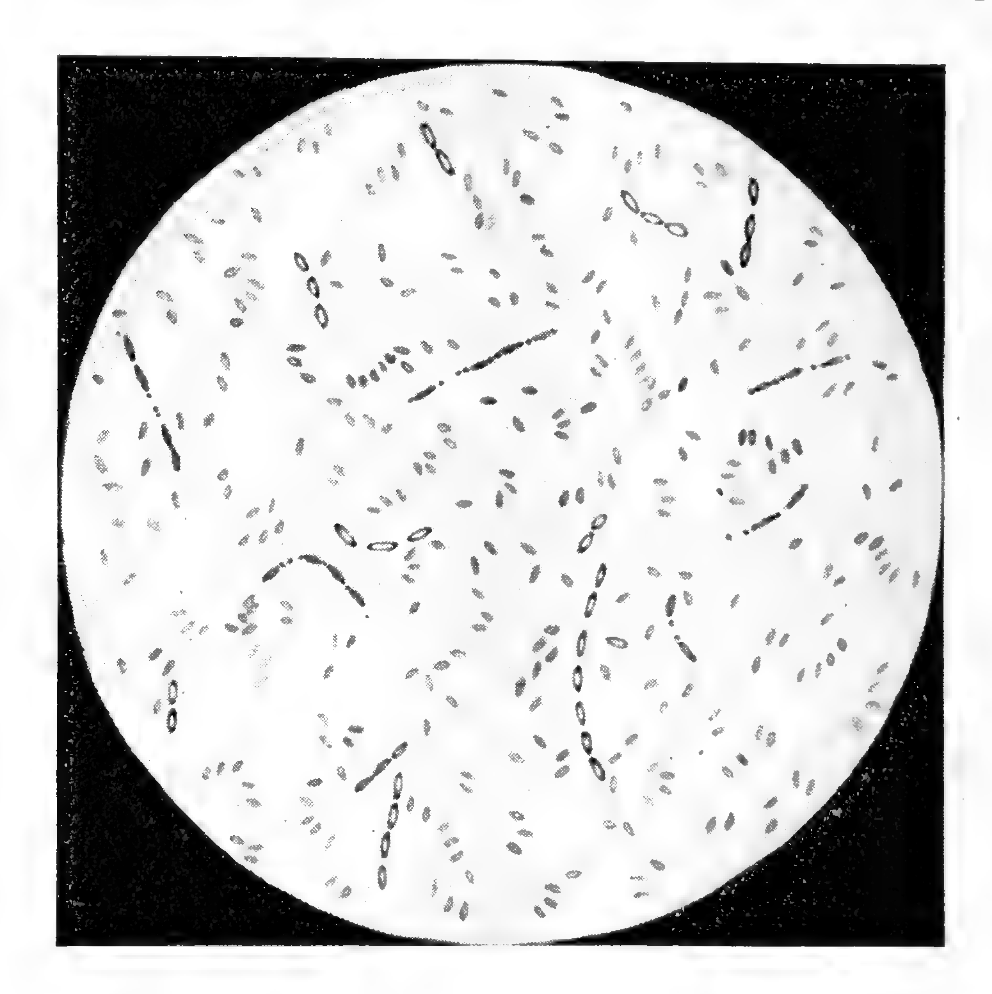


Fig. 3. — Culture de cinq jours en bouillon; spores.

l'aspect dendritique, répandent autour d'eux de fines granulations qui se colorent par le Gram. Ils sont souvent agglutinés, en amas indistincts, finement dentelés.

B. — Caractères de culture.

1° Conditions de cultures. — Ce bacille est essentiellement aérobie. La température optima de culture est entre 35° et 38°. Il pousse dans les milieux neutres, légèrement acides ou alcalins. Le milieu couramment employé est le bouillon Martin.

2° Bouillon. — Au bout de quelques heures, apparaît un

trouble léger, puis se forme un voile blanc, non plissé, fragile, qui se brise et tombe en fragments au fond du tube à la moindre agitation. Le voile s'étend parfois aux parois du tube de verre.

3° Gélatine. — Par piqûre, en glacière, entre 5° et 15°, quelques rares colonies se forment en profondeur, la surface se recouvre d'une membrane épaisse. La gélatine se liquéfie



Fig. 4. — Cils.

Bacillus asthenogenes. Gross. = 1/1.200.

en surface ; la liquéfaction gagne progressivement vers la profondeur.

4° Gélose. — Sur gélose, après quelques heures, il se forme un enduit crémeux, gras, blanchâtre, avec voile sur l'eau de condensation.

5° Plaques de gélose. — Les colonies isolées sont rondes, hérissées de fins tractus filamenteux qui leur donnent un aspect madréporique.

6° Gélose de Sabouraud. — Aspect analogue aux cultures sur gélose.

7° Pomme de terre. — Il se produit un enduit crémeux, blanchâtre.

8° Lait. — De vingt-quatre à soixante-douze heures, formation de trois couches, masse crémeuse en surface, liquide citrin et trouble au milieu, dépôt granuleux au fond du tube.

C. — **Propriétés biologiques.**

1° Réactions biochimiques. — En bouillon sucré carbonaté, en gélose profonde sucrée, ce microbe ne donne de gaz avec aucun sucre.

Par piqûre, sur gélose sucrée tournesolée, il fait virer au rouge les géloses maltosée, saccharosée, glucosée, lévulosée, dextrinée, et fait virer au rose la gélose galactosée. Il reste sans action sur les géloses lactosée, dulcitée, raffinosée. Toutefois, après plusieurs passages sur gélose, l'action sur les sucres ne tarde pas à être moins régulière.

En milieu bouillon sang, il provoque l'hémolyse des globules rouges. L'opacité du mélange des globules rouges et du bouillon légèrement alcalin disparaît, le liquide est clarifié, il prend l'apparence d'un vin de porto filtré qui ne se trouble plus par agitation, comme si la masse sanguine avait été dissoute. Après deux ou trois jours, le milieu revêt l'aspect d'un vin de madère brunâtre, et il se forme un dépôt de même teinte. Le bacille ne noircit pas la gélose en plomb. Il ne produit pas d'indol.

2° Vitalité. — Il donne une spore très résistante aux agents de destructions et, en particulier, à la chaleur.

Il pousse à 45°. Une culture en bouillon, chauffée à 100° pendant cinq minutes, n'est pas stérilisée; quelques gouttes de cette culture, portées dans un tube de bouillon, donnent une nouvelle culture caractéristique. A 120° la stérilisation est constamment obtenue.

Les spores, mélangées à la terre contenue dans les sacs de riz (1) destiné à l'alimentation, conservent leur vitalité pendant plusieurs mois.

(1) Tous les échantillons de riz et de paddy (riz non décortiqué), prélevés chez les petits détaillants de Saïgon et dans la campagne chez les rizicul-

Ensemencé dans une série de tubes contenant des doses croissantes d'acide chlorhydrique d'une part, de lessive de soude d'autre part, il donne une culture caractéristique en vingt-quatre heures jusqu'au tube contenant 0 gr. 438 d'acide chlorhydrique par litre ; en soixante-douze heures jusqu'au tube contenant 0 gr. 546 d'acide par litre ; en vingt-quatre heures, jusqu'au tube contenant 0 gr. 87 de lessive de soude 30° Beaumé, exprimé en carbonate de soude (1).

La bile est pour lui un milieu défavorable ; on n'obtient jamais d'hémoculture en bile avec le sang des malades qui cultive en quelques heures en bouillon lait. L'ensemencement d'un échantillon, bien adapté aux milieux de culture usuels, donne une culture en bile retardée en quarante-huit à soixante-douze heures. Un grand nombre de bacilles paraissent granuleux, en voie de bactériolyse. La culture revêt néanmoins, en quelques jours, l'aspect caractéristique avec son voile friable de surface. Le microbe s'est adapté au milieu.

3° Virulence et toxicité. — Les germes isolés du riz ont transmis la maladie expérimentale au porcelet. Les souches prises parmi les cas cliniques de gravité diverse ont manifesté une virulence sensiblement égale. Même remarque au point de vue de la toxicité. La spore fixe la virulence et le pouvoir toxi-

teurs, ont permis d'obtenir l'isolement du microbe. Ce germe, très répandu dans la nature, trouve donc dans le milieu chaud et humide des rizières des conditions favorables à son développement.

Si, prenant un échantillon quelconque de riz de Cochinchine, on fait deux parts, l'une maintenue telle quelle, l'autre cuite à la mode annamite (coction dans l'eau portée pendant quinze minutes à l'ébullition) et si on ensemence ces deux parts dans deux séries de tubes, on observe le fait suivant : le riz non cuit donne une culture très impure de germes divers contenant des bacilles répondant aux caractères du microbe qui nous occupe ; le riz cuit à la mode annamite donne une culture à peu près pure du même microbe, et même parfois tout à fait pure. Très fréquemment est associé un petit microcoque ne prenant pas le Gram, dont il conviendra de poursuivre l'observation. Le chauffage du riz en quinze minutes a donc opéré une sorte d'isolement du bacille qui, après refroidissement du riz, pourra trouver des conditions favorables à sa multiplication ou tout au moins à sa conservation.

(1) La résistance du microbe à l'acidité et à l'alcalinité du milieu lui permettra de survivre dans le riz mélangé aux condiments et aux sauces de la cuisine indigène. L'acidité du suc gastrique normal étant de 1 gramme à 1 gr. 50 par litre, on peut admettre que, dans certains états fonctionnels ou même dans la masse du bol alimentaire, l'estomac peut présenter, au point de vue de l'acidité, des conditions susceptibles de ne pas gêner le développement de ce microbe.

gène. L'étude de la maladie expérimentale a été poursuivie avec les mêmes échantillons dont le vieillissement s'est accentué depuis quinze jours jusqu'à dix mois. Les réactions des animaux sensibles ont été identiques.

D. — Toxine.

Si on ensemence en bouillon Martin une série de boîtes de Roux, placées à plat pour avoir la plus large surface d'aération, avec une culture de seize heures du bacille, le filtrat de la culture ne présente aucun pouvoir toxigène appréciable pendant les trois ou quatre premiers jours. Cette toxicité apparaît vers le sixième jour et s'accentue jusqu'au quinzième jour.

Mais on obtient une toxine de valeur égale ou supérieure en employant la méthode de Besredka pour la préparation des endotoxines (Besredka. Ces *Annales* 1904. *Revue générale du Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1916).

Cette toxine est active sur le porcelet, qui accuse les mêmes troubles que sous l'action des microbes vivants, à un moindre degré sur le lapin, la souris.

Les effets de la toxine seront exposés au chapitre de la maladie expérimentale.

E. — Détermination.

Le bacille qui vient d'être décrit présente avec *Bacillus megatherium* (de Bary) des caractères culturaux et biochimiques communs.

Cependant, tandis que *Bacillus megatherium* ne modifie pas le petit-lait tournesolé et le bouillon au rouge neutre, le premier décolore en vingt-quatre heures le petit-lait tournesolé qui reprend en trois jours sa teinte initiale et produit le caméléonage du rouge neutre.

D'après H. Vincent (ces Annales 1898), *Bacillus megatherium*, microbe non pathogène très répandu dans la nature, est inoffensif pour les animaux de laboratoire, même par association de microbes favorisants, par affaiblissement préalable de l'animal infecté, par traumatisme de la région inoculée, par injection massive de cultures.

Il peut devenir pathogène par passages en sacs de collodion dans le péritoine du lapin, et tuer, par septicémie suraiguë, la souris et le lapin. L'apparition de la virulence et de la toxicité s'accompagne d'un changement manifeste dans les caractères culturaux : à l'état normal *Bacillus megatherium* donne en bouillon un voile assez épais, bordé d'une collerette, le bouillon

sous-jacent restant presque clair et renfermant quelques grumeaux visibles par agitation; au quatrième passage en sac de collodion, la culture en bouillon donne un trouble abondant et uniforme avec ondes chatoyantes, sans voile ni collerette. Les attributs pathogènes ne se conservent que par la culture en sac. Abandonné à lui-même et réensemencé à l'air, il perd en trois mois sa virulence et sa toxicité et ne les reprend que par trois passages en sac.

Le bacille qui nous occupe est pathogène pour le porcelet, le lapin, la souris. Les passages sur gélose ordinaire pendant un an n'atténuent pas d'une manière appréciable sa virulence et sa toxicité. L'aspect des cultures est la même au sortir de l'organisme infecté et après cultures à l'air libre sur milieux usuels pendant de longs mois, et cet aspect est analogue à celui des cultures de *Bacillus megatherium* non pathogène.

En admettant même que ce microbe pathogène ait pour origine un *Bacillus megatherium*, il a acquis des caractères propres assez différenciés pour constituer une espèce différente; je proposerai de le désigner sous le nom de *Bacillus asthenogenes*, nom qui indique un des caractères essentiels de son action pathogène.

DEUXIÈME PARTIE

MALADIE NATURELLE DE L'HOMME

212 hémocultures ont été effectuées, à l'Institut Pasteur de Saïgon, du 15 juin au 1er novembre 1919, au cours de fièvres continues, étiquetées sous des noms différents, selon le symptôme dominant. *Bacillus asthenogenes* a été isolé 92 fois, soit 61 fois sur des indigènes adultes et 31 fois sur des Européens.

L'isolement de ce bacille conduit à dégager des cas particuliers la symptomatologie générale des états fébriles dans lesquels il a été retrouvé.

A. — Symptomatologie générale.

1° Description clinique. — Le tableau clinique n'est pas immuable; mais, si l'intensité relative de certains symptômes est variable, il est facile de reconnaître l'existence de signes constants.

Nous prendrons comme type une forme de gravité moyenne évoluant chez l'adulte.

Lorsque le sujet entre à l'hôpital, il est malade depuis plu-

sieurs jours. Il dit avoir présenté un état fébrile plus ou moins accentué. Il se détermine à réclamer des soins, en raison de la persistance de la fièvre et de l'insomnie, d'une courbature et d'une fatigue générales très pénibles, d'une répugnance très vive pour toute alimentation, même liquide, et d'une constipation opiniâtre.

Les phénomènes nerveux dominent. L'expression d'accablement, la prostration, le facies typhique, font penser aussitôt à un état infectieux des plus graves.

Le malade prend parfois une attitude figée, presque contracturée. Le moindre mouvement est douloureux, surtout au niveau de la nuque, des lombes et des membres inférieurs. Il ne peut pas se mouvoir, s'asseoir dans son lit, mettre les pieds à terre. Un examen rapide montre que ces douleurs, comparables à la meurtrissure de contusions larges et profondes, ne sont pas articulaires et qu'elles intéressent uniquement les masses musculaires. Elles sont spontanées, la pression les exagère. Elles n'ont pas apparu d'une façon foudroyante aux premières heures de la maladie. Elles ont été précédées d'une sensation de courbature qui accompagnait la poussée fébrile et qui s'est rapidement accentuée.

En même temps, le malade accuse un affaissement total de ses forces, une hypotonicité musculaire, une asthénie qui persiste et s'aggrave même après la disparition des douleurs. Il est anxieux, et se considère comme mortellement atteint.

L'insomnie dure depuis deux à trois jours. A l'état de veille succède parfois une vague somnolence traversée de cauchemars, sorte de délire onirique qui accompagne la période fébrile. Pas de délire proprement dit.

La céphalée est vive, gravative, non lancinante.

La langue est saburrale, blanche ou jaunâtre, sèche en son milieu, rouge sur les bords, comme élargie, marquée d'encoches dentaires très nettes. Un enduit blanchâtre recouvre les gencives au pourtour des dents. Les piliers et le voile du palais présentent un énanthème plus ou moins fugace.

L'état gastro-intestinal attire l'attention des malades surtout par l'inappétence absolue et la constipation qui est la règle.

Pas de gargouillement de la fosse iliaque droite. La palpation de l'abdomen ne révèle aucun point douloureux.

Le foie et la rate ne sont pas augmentés de volume.

Du côté de l'appareil urinaire, on observe de l'oligurie à la période aiguë, la présence de traces d'albumine et une diminution des chlorures qui peuvent descendre à 0 gr. 20 par litre.

Au point de vue circulatoire, aucun trouble net. Pas de dicrotisme du pouls, qui bat entre 80 et 100 pulsations à la minute pendant les poussées fébriles.

Le malade n'attire pas l'attention sur les symptômes pulmonaires. Parfois cependant il a une petite toux sèche. A l'auscultation, dans presque tous les cas, on perçoit de petits râles humides, fugaces. Pas de souffle ; rien à la percussion.

La fièvre fournit le caractère constant de n'être pas influencée par la médication quinique, de ne pas présenter de stades nettement alternés de frissons, de chaleur, et de sueur. Elle dure en moyenne de cinq à sept jours. Il arrive fréquemment que les malades sont observés au dernier jour de l'hyperthermie, au moment où l'asthénie est le plus accentuée, mais où la convalescence va commencer. Presque toujours, ils entrent à l'hôpital après trois ou quatre jours de fièvre. Par suite, il est difficile de reconstituer la courbe fébrile exacte et complète. Dans les cas les plus rebelles la fièvre dure un ou deux septénaires.

On peut distinguer plusieurs types fébriles : 1° la température atteint 39° ou 40° au moment du premier examen ; elle tombe à 38°, 37°5 le jour suivant pour remonter à 37°5, 39° pendant un ou deux jours, et revenir à la normale en vingt-quatre heures ; 2° la température reste au-dessus de 38°, le plus fréquemment entre 39° et 40° pendant cinq à six jours, pour redescendre en quarante-huit heures jusqu'à la normale ; 3° la température, après avoir affecté une des deux premières formes, se prolonge au delà du premier septénaire en donnant des oscillations accentuées ; 4° dans les formes les plus bénignes, le malade porte sa fièvre légère sur pieds, et le diagnostic est fait d'une façon fortuite par le laboratoire.

Lorsqu'il est possible de prendre la température 4 fois par jour, on constate qu'elle est déjà élevée le matin à 7 heures, atteint son maximum entre midi et 16 heures, et redescend vers 17 heures, tout en restant supérieure à ce moment à la température du matin.

A la fin de la période fébrile, au moment de la chute de la température, apparaît une éruption rubéolique d'intensité et de durée très variables, tantôt rougeur fugace intéressant le thorax et les épaules et disparaissant en quelques heures, tantôt érythème envahissant la face et le corps entier, particulièrement marqué sur le thorax, aux fesses et aux cuisses et s'effaçant progressivement en deux ou trois jours.

Cet érythème est caractérisé par une rougeur vive et uniforme résultant de la confluence des points hyperhémiques miliaires, acuminés, perceptibles au toucher. Sur les points les plus confluents, on distingue les points rouges, bien individualisés, séparés par des espaces de peau saine.

Les conjonctivites palpébrables et oculaires sont congestionnées, humides. Il n'y a pas de photophobie.

Au moment de la chute de la température, ou quelques heures plus tard, le malade éprouve une sédation brusque, des phénomènes de courbature et de douleurs musculaires. Son visage angoissé, son aspect typhique, impressionnants la veille au soir encore, ont fait place le lendemain à une expression de détente. En même temps les urines deviennent de plus en plus abondantes, l'albumine disparaît, le taux des chlorures restant très faible.

Mais si la myalgie, la difficulté des mouvements ont à peu près disparu, une asthénie profonde persiste qui se prolonge plusieurs jours.

Dans certains cas graves, le sujet, qui ne souffre plus en s'asseyant sur son lit, ne peut se tenir debout. Il fléchit sur ses jambes. Les réflexes rotuliens sont diminués. On constate du ballottement du pied. Quelques jours plus tard, il se tient debout et parvient à se déplacer en traînant les jambes, en butant avec la pointe du pied. L'amélioration s'accentue. Il marche aisément, mais il ne peut gravir les marches d'escalier qu'en prenant appui sur ses deux bras.

Enfin ces phénomènes d'asthénie musculaire s'atténuent rapidement et la guérison totale survient.

Trois décès ont été observés dans des cas où le bacille avait été isolé de la circulation générale. Il s'agissait de deux prisonniers annamites très émaciés et d'un militaire français atteint de syphilis grave ancienne. En admettant que la mort soit due



FIGURE 5.

I II

Maladie humaine : I, type de la fièvre en plateau, forme de gravité moyenne ; II, type de forme bénigne.

au germe infectieux isolé, elle resterait une terminaison exceptionnelle de la maladie.

Les formes cliniques peuvent être provisoirement classées d'une façon schématique, sous trois types :

1° Les formes moyennes répondant à la symptomatologie qui vient d'être décrite, suivies de guérison;

2° Les formes graves se terminant exceptionnellement par la mort, à la fin de la période fébrile; dans des cas, la crise finale peut être marquée par une hyperthermie atteignant 42° à 43°;

3° Les formes bénignes, attribuées à un embarras gastrique bénin que le malade porte sur pieds.

Nous verrons plus loin qu'il est permis de se demander, en s'appuyant sur l'étude de la maladie expérimentale du porcelet, s'il n'existerait pas chez l'indigène des formes rebelles ou incurables des troubles de la motricité, consécutifs à des poussées fébriles, passées inaperçues et classéees, actuellement dans des groupes de maladies absolument distincts des fièvres climatiques. Il est intéressant de poser la question dans le programme de recherches ultérieures.

2° Hématologie.

Pour l'interprétation des résultats, il faut tenir compte de ce que le malade se fait rarement hospitaliser au début de l'affection. Les premiers

Malades en traitement à l'hôpital (hémocultures positives).

	Petits lymphocytes	Gros lymphocytes	Polymorphes amphophiles	Polymorphes acidophiles	Myélocytes cellules d'initiation	
Formule normale. .	20	5	69	5	1	Moyenne de 10 examens.
A l'entrée à l'hôpital.	1	34	53	10	1	5e-7e jour de maladie.
2 jours après	10	20	56	10	4	
5 — —	1	30,5	55	9,5	4	
8 — —	1	37	51	5	6	
10 — —	1	23	59	10	7	
2 semaines après. .	»	28,5	59	8	4,5	
3 — — . .	»	39	51	9	1	

examens de sang ne sont faits que vers le cinquième jour de la maladie à la période d'état.

La leucopénie est accusée. Les polymorphes amphophiles restent un peu au-dessous de leur taux normal pendant toute la durée de la maladie. Les petits lymphocytes disparaissent de bonne heure; les grandes formes mononucléées se multiplient, et, dans les formes prolongées, la mononucléose est nette au déclin de la maladie. L'acidophilie et la myélocytose sont précoces, présentent leur maximum vers le dixième jour et persistent très longtemps. Le parallélisme de variations de ces deux éléments, myélocytes et acidophiles, est remarquable et semble un des meilleurs caractères spécifiques de l'hématologie de la maladie.

3° Anatomie pathologique. — Deux autopsies de prisonniers peuvent seules être retenues sous cette réserve qu'elles ont eu lieu huit à dix heures après la mort. Elles ont donné lieu à des constatations identiques dans les deux cas.

Pas d'épanchement dans la plèvre. Poumons congestionnés surnageant dans l'eau en tout ou par fragments. Poids normal.

Épanchement péricardique peu abondant, d'aspect citrin. Cavités cardiaques pleines de caillots. Muscle cardiaque mou et flasque.

Pas d'épanchement dans le péritoine. Rate normale. Foie normal. Reins et capsules surrénales congestionnés. Estomac vide d'apparence normale.

La muqueuse de l'intestin grêle présente au niveau dn duodénum et de la partie du jéjunum qui lui fait suite une congestion légère avec quelques points de suffusion sanguine, sans gonflement ni ulcération. Gros intestin normal contenant des matières durcies. Rien de particulier du côté des ganglions mésentériques et par ailleurs.

Examen bactériologique des deux cadavres :

Le bacille qui avait été isolé par hémoculture chez les deux sujets dans la dernière semaine de la maladie, est retrouvé à l'état impur : 1° sur le premier cadavre, dans la sérosité pulmonaire, la rate et les reins, par frottis; dans les poumons, le foie, la rate, les reins, les capsules surrénales, par culture de la pulpe des organes, en bouillon-lait ; 2° sur le deuxième cadavre, dans l'urine contenue dans la vessie distendue, à l'examen direct, dans les poumons par culture de la pulpe de ces organes.

Les germes isolés des cadavres présentent les caractères culturaux biochimiques des germes isolés du sang au cours de la maladie.

B. — Diagnostic clinique.

Au moment où le malade se présente à l'examen, il accuse les caractères d'un état infectieux grave. Le diagnostic différentiel doit être fait entre la fièvre qui vient d'être décrite, les fièvres typhoïdes ou paratyphoïdes, les septicémies diverses et, notamment chez les jeunes accouchées la fièvre puerpérale, la dengue, le paludisme de première invasion et, dans les cas

les plus graves, l'accès pernicieux. Dans certains cas d'éruption confluente, on peut penser aux fièvres éruptives. Enfin, la symptomatologie doit être comparée aux caractères de la pseudo-dengue, de la fièvre des cinq et des sept jours, de la fièvre des ports d'Extrême-Orient et de l'Inde.

C. — Diagnostic microbiologique.

Le diagnostic microbiologique doit être poursuivi par la recherche du microbe :

1° Dans la circulation générale;

L'hémoculture en bouillon-lait, à parties égales, réalise les conditions les plus favorables.

2° Dans l'urine;

3° Dans la cavité buccale et le pharynx;

4° Dans les matières fécales;

Un fragment du volume d'un grain de riz est dilué dans 10 cent. cubes d'eau physiologique, la dilution est chauffée à 100° pendant dix minutes Après refroidissement, quelques gouttes sont ensemencées par stries sur trois boîtes de Petri sans recharger la spatule. Après vingt-quatre heures, les colonies du bacille apparaissent nettement au milieu de quelques autres colonies microbiennes.

5° Par inoculation du sang des malades au porcelet.

2 à 5 cent. cubes de sang sont prélevés, selon la méthode habituelle, dans une veine du pli du coude, avec une seringe contenant de 1 à 2 cent. cubes de citrate de soude à 1 p. 100, et immédiatement injectés dans la masse musculaire de la cuisse d'un jeune porcelet de 3 à 4 kilogrammes, dont la peau a été soigneusement rasée, désinfectée à la teinture d'iode et à l'alcool à 90°. Le point de pénétration de l'aiguille est recouvert de collodion.

Vingt-quatre heures après, la région inoculée présente les signes d'une inflammation plus ou moins accentuée. Une ponction faite au moyen d'une seringue stérilisée, l'aspiration étant poursuivie depuis la profondeur du muscle jusque sous la peau, ramène de quelques gouttes à 2 cent cubes de sérosité sanguinolente. Une partie de cette sérosité est ensemeneée dans un ou plusieurs tubes de bouillon-lait; ce qui reste est étalé en frottis ou en goutte épaisse sur des lames neuves et soigneusement décapées à l'acide chlorhydrique.

L'examen de ces lames montre, en culture pure, la présence du bacille avec ses caractères morphologiques. Le tube bouillon-lait donne une culture pure abondante du même germe qui peut être identifié.

L'animal inoculé est tenu en observation. Trois cas peuvent se présenter : 1° accident local sans généralisation; 2° maladie expérimentale se terminant par la guérison; 3° maladie grave se terminant par la mort.

L'emploi du porcelet comme animal d'expérience ne peut être généralisé en raison de son prix élevé. Les essais pratiqués sur le lapin et le cobaye ont donné des résultats inconstants. La souris blanche est un animal de trop petite taille pour recevoir la quantité de sang susceptible de provoquer l'infection.

6° Par frottis de sang sur lames.

Cette recherche utile pour le diagnostic différentiel avec le paludisme, a toujours été négative pour *Bacillus asthenogenes.*

Séro-diagnostic :

L'application de la séro-réaction de F. Widal au diagnostic clinique n'a pu être réalisée jusqu'à ce jour en raison de l'agglutination spontanée des bacilles dans les tubes témoins.

La fixation du complément donne des résultats positifs dans le cas de formes graves et de longue durée.

La recherche du microbe dans les matières fécales et dans la bouche n'a pas de valeur clinique, ce microbe se trouvant en abondance dans le riz.

L'hémoculture ne donne pas de résultat constant. Nous verrons plus loin que, dans la maladie expérimentale, l'hémoculture pratiquée au moment même où l'animal va être sacrifié est négative, alors même que l'examen des viscères, par frottis, décèle, quelques minutes plus tard, la présence du germe infectieux dans le parenchyme des organes.

L'uroculture ne donne pas un résultat certain dans tous les cas.

La méthode véritablement utile et applicable en clinique doit être recherchée dans la mise au point d'un mode de séro-diagnostic.

D. — Classement de la maladie.

La bénignité habituelle des fièvres climatiques, qui contraste avec la violence des symptômes et la gravité apparente de la maladie, fait rejeter par les cliniciens les cas sérieux ou mortels dans les formes atypiques des pyrexies connues. Les autopsies sont très rares et pratiquées trop tardivement. Ces conditions rendent difficiles les recherches de laboratoire.

Pour arriver à faire des sections opportunes dans ce bloc des fièvres indéterminées, il convient de s'affranchir de la préoc-

cupation des divisions cliniques assez arbitraires qui ont été établies. L'étude des micro-organismes suspects isolés au cours de fièvres supposées climatiques, le groupement autour de chacun d'eux des faits cliniques et expérimentaux concordants, l'observation prolongée de ces mêmes faits dans des régions différentes, conduiront à sérier les types morbides mis en lumière et à établir dans quelle mesure les divisions actuelles répondent à la réalité.

L'ensemble des faits acquis permet de proposer pour la maladie décrite le nom de « fièvre asthéno-myalgique » qui résume ses caractéristiques principales. Ce nom provisoire est destiné à situer dans la nosologie locale, cette entité morbide, sans préjuger de la question de savoir si elle s'identifie avec une ou plusieurs maladies climatiques reconnues, ou si elle constitue un type fébrile méconnu.

TROISIÈME PARTIE

LA MALADIE EXPÉRIMENTALE

La maladie naturelle au cours de laquelle le bacille a été isolé n'a été observée que chez l'homme. Certains animaux peuvent contracter la maladie expérimentale.

A. — Animaux réceptifs et animaux réfractaires.

L'animal de choix est le porcelet. Il présente une sensibilité à l'infection telle qu'il reproduit dans ses traits essentiels la maladie naturelle de l'homme. Il contracte parfois une maladie beaucoup plus sévère que la maladie humaine. Son attitude et ses réactions permettent une analyse détaillée des symptômes.

La souris blanche succombe en quelques heures à l'injection sous-cutanée de cultures.

Le lapin est irrégulièrement sensible, il ne fournit que des symptômes assez frustes. A défaut de porcelets, il serait l'animal d'expérience le plus utile.

Le cobaye, très résistant, succombe parfois à l'ingestion par la voie gastrique.

Le singe macaque est réfractaire.

B. — Technique des inoculations.

1° Nature du matériel d'inoculation.

Ont été utilisés : 1° les cultures en divers milieux; les cultures de douze à vingt-quatre heures, dans lesquelles les bacilles sont très mobiles, sont les plus recommandables. L'infection peut être obtenue avec les spores; 2° le sang de l'homme ou des animaux malades; 3° les organes d'animaux infectés; 4° la toxine.

2° Voies d'inoculation.

La transmission de la maladie peut se faire par : 1° la voie buccale au moyen d'un repas infectant; 2° la voie gastrique, à la sonde œsophagienne ; 3° la voie sous-cutanée ou intramusculaire; 4° la voie intraveineuse chez le lapin; 5° la voie péritonéale.

3° Doses du matériel d'inoculation.

Pour les ingestions, culture en bouillon de dix-huit heures, 5 à 10 cent. cubes chez le porcelet; 1 à 2 cent. cubes chez le lapin; 1 cent. cube chez le cobaye; 0 c. c. 5 chez la souris. Pour les inoculations sous-cutanées ou intramusculaires de 1/20 de cent. cube à plusieurs cent. cubes chez le porcelet; 1 à 2 cent. cubes chez le lapin; 1/50 à 1/2 cent. cube chez la souris. Mêmes doses pour les injections intraveineuses chez le lapin.

C. — Maladie expérimentale du porcelet.

1° Symptomatologie générale consécutive a tous les modes d'inoculation. — Quelle que soit la voie d'inoculation et les doses employées, quand la maladie expérimentale est déclarée, elle présente une symptomatologie particulière qui ne prête à aucune confusion avec les maladies naturelles connues de l'espèce porcine.

Les porcelets de 4 à 5 kilogrammes ont des formes arrondies, le poil lisse et brillant. Leur rachis présente une courbure à concavité inférieure très accentuée, c'est-à-dire une dépression marquée de la région dorso-lombaire. Ils sont voraces, gais, très mobiles. Leur température normale oscille entre 39° et 39°5.

Dès que la maladie se déclare, le porcelet devient triste. Son poil se hérisse (poil piqué). Il cherche à se dissimuler dans un coin de cage.

La fièvre apparaît, accompagnée de frissons musculaires

d'abord légers et espacés, puis plus violente et continue. Dans les formes graves, l'animal est agité de véritables secousses, profondes, prolongées, ininterrompues. Il pousse des grognements plaintifs. Il se couche, se relève, change de place, en proie à une agitation douloureuse, puis il s'allonge marquant l'appréhension d'être touché ou déplacé. Il ne dort plus. Il cesse de manger. Après quarante-huit heures ou plusieurs jours, l'animal prend, dans la position debout, une attitude caractéristique. La courbure concave du rachis dans la région dorso-lombaire est devenue convexe, le dos est arrondi au lieu d'être creusé (rein voussé). Les membres postérieurs légèrement fléchis sont fortement ramenés en avant sous l'abdomen, vers les membres antérieurs (position du rassemblé); les cuisses en abduction par rapport au bassin, les jarrets rapprochés s'étayant l'un sur l'autre, les jambes divergeant, les pieds portés en dehors forment un triangle isocèle dont le sommet est marqué par la jonction des jarrets (jarrets clos). Les onglons sont écartés.

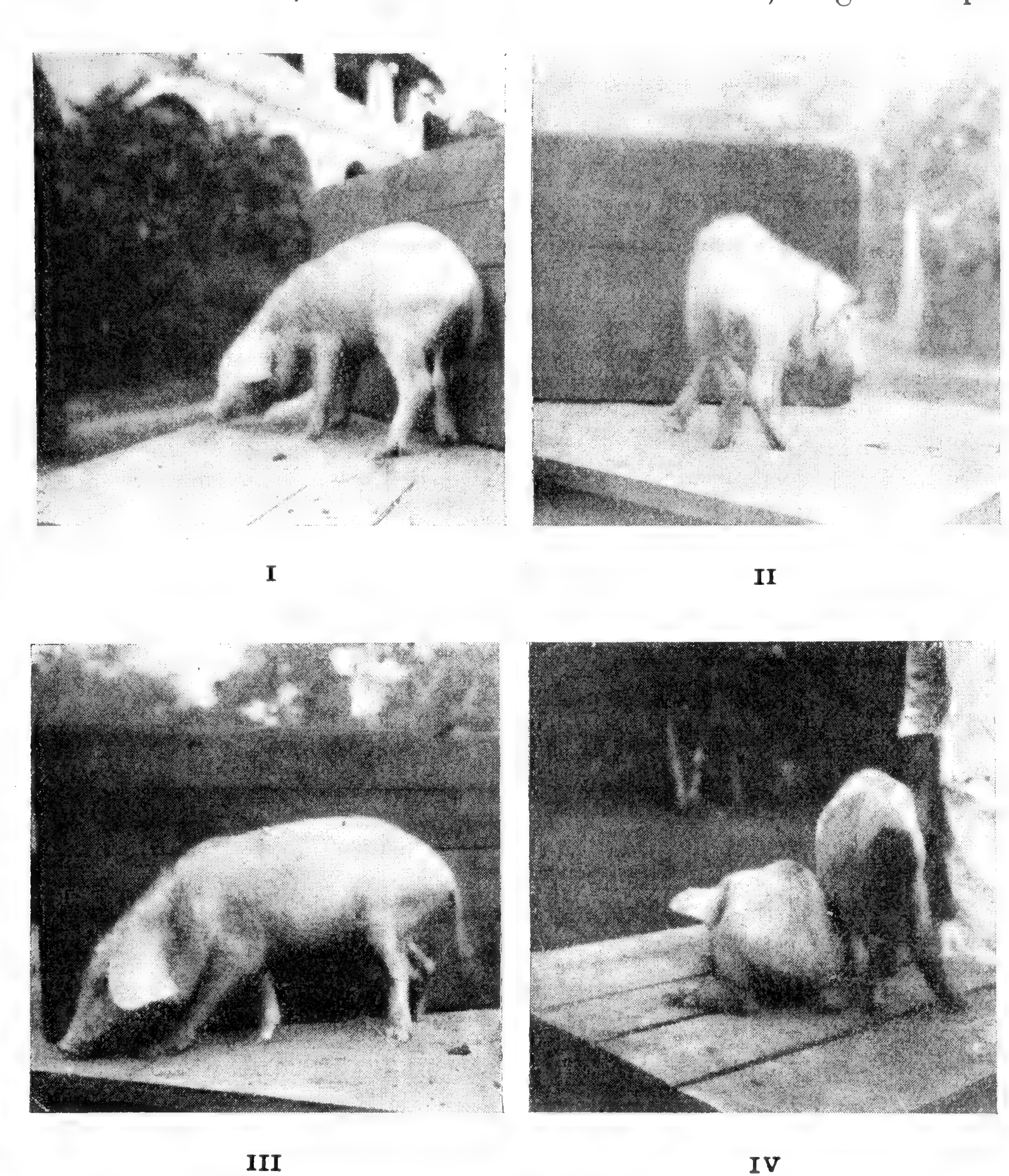
Cette attitude n'est liée à aucune paralysie ou parésie des membres postérieurs. Il semble qu'il y ait simplement asthénie musculaire du train postérieur. Si l'on essaie de le faire marcher ou courir, l'animal se déplace, les membres ramassés, soudant les articulations dont le jeu est réduit au minimum (reins soudés). Il fléchit brusquement après quelques pas. Cette démarche contraste avec l'allure dégagée, souple, élastique, des animaux sains témoins. Dans les cas d'asthénie les plus accentués, l'animal arrive à se déplacer en rampant sur le ventre, traînant, inertes, les membres postérieurs.

En trois ou quatre jours son embonpoint disparaît, les saillies osseuses s'accusent sous la peau; en moins d'une semaine il a le facies cachectique.

La durée de la maladie est variable. La mort ou la convalescence viennent entre le sixième et le quinzième jour. La mort est exceptionnelle. Quand elle se produit, la température, qui n'a cessé d'osciller entre 40° et 42°, baisse brusquement; le porcelet se couche sur le flanc pour ne plus se relever, et la fin survient rapidement.

Le plus souvent la fièvre fléchit, l'animal commence à s'alimenter.

En 24 heures son allure se modifie ; le poil est plus lisse ; la voracité naturelle, la vivacité des mouvements, la gaîté repa-



I II

III IV

Fig. 6. — Attitude caractéristique du porcelet au cours de la maladie expérimentale : I, pendant la période aiguë; II, III, IV, à l'état chronique avec aggravation progressive.

raissent. La guérison peut survenir complète ou avec persistance de séquelles plus ou moins graves.

Dans le cas d'atteinte légère, le porcelet revient rapidement à la normale et reprend son embonpoint.

Dans les formes graves, malgré le retour de l'appétit et d'une activité plus grande, l'animal reste cachectique. Il conserve la

même attitude vicieuse (rein voussé, position du rassemblé, jarrets clos, reins soudés).

Dix porcelets atteints de cette forme grave ont été conservés plus de trois mois en observation, dans les conditions les plus favorables de repos et d'alimentation. Six d'entre eux ont présenté une légère amélioration des troubles fonctionnels de la station debout et de la marche. Les 4 autres sont restés cachectiques, leur attitude vicieuse s'est accentuée, tout leur système musculaire paraissant atrophié, en particulier les muscles des lombes et du train postérieur. La station debout est devenue de plus en plus difficile, l'animal se couchant quelques minutes après avoir été relevé, traînant son train postérieur sur le sol pour se déplacer. L'un d'entre eux a succombé après 4 mois, au dernier degré de la misère physiologique.

La constipation est la règle dans toutes les formes bénignes ou moyennes pendant toute la période fébrile. Elle cesse quand l'animal revient à la température normale, retrouve l'appétit et l'activité ordinaires.

Dans tous les cas mortels, après plusieurs jours de constipation, une diarrhée profuse, jaune clair, qui contraste avec la couleur vert foncé des fèces, s'établit pour continuer jusqu'à la mort. Elle caractérise les cas mortels à évolution rapide. L'anatomie pathologique montre qu'elle coïncide avec des lésions graves de l'intestin grêle, après infection par ingestion

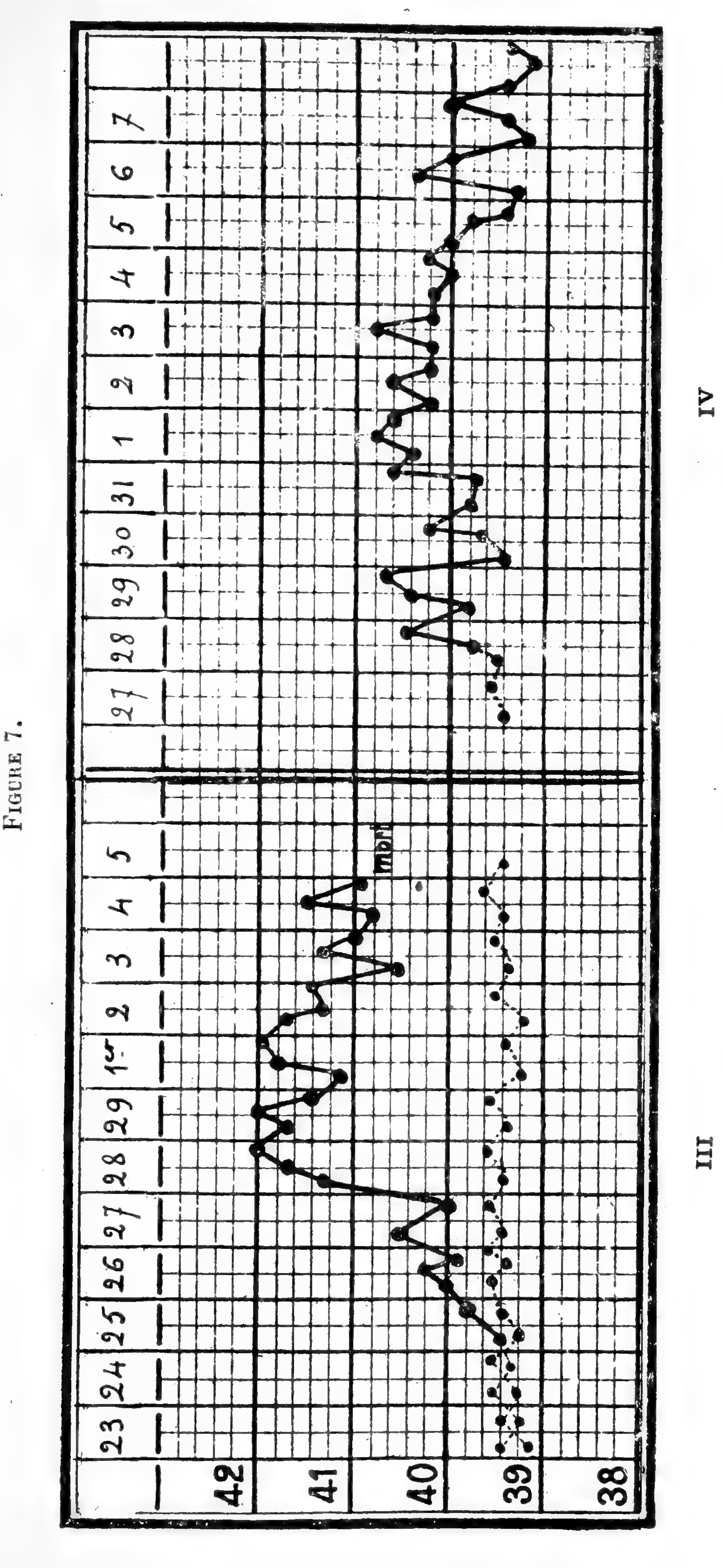
Aucun symptôme n'indique une lésion pulmonaire; ni toux, ni jetage. Cependant, à l'autopsie, tous les animaux présentent, dès les premières heures de l'infection, des points de suffusions sanguines, de petites hémorragies nodulaires.

Aucun symptôme cardiaque appréciable.

Les urines, rares pendant la période aiguë de la maladie, deviennent abondantes au moment de la sédation des symptômes. A l'autopsie, il est fréquent d'observer que la vessie est distendue et pleine de liquide légèrement trouble. L'analyse montre la présence d'albumine, la diminution accentuée des chlorures (moins de 0 gr. 20 par litre).

2° Symptomatologie spéciale en relation avec la voie d'accès du germe infectieux. — La symptomatologie générale se reproduit d'une façon constante. L'intensité relative des symptômes

FIGURE 7.



Maladie expérimentale du porcelet : III, 1° la ligne pointillée indique le tracé thermométrique du porcelet sain témoin ; 2° la ligne pleine indique le tracé thermométrique du porcelet, inoculé par ingestion d'un repas infectant, à la date du 25, à 9 heures du matin. Forme mortelle ; IV, tracé thermométrique d'un porcelet inoculé par ingestion d'un repas infectant à la date du 28, à 9 heures du matin.

varie suivant le degré de gravité de la maladie, quelle que soit la voie d'entrée du germe infectieux dans l'organisme.

Mais certains symptômes correspondent à la voie d'accès du microbe.

Symptômes locaux. — L'injection sous-cutanée ou intramusculaire de cultures pures ou de sang des malades donne une lésion locale très caractéristique. Elle consiste en un gonflement de la région inoculée, accompagné d'œdème, de rougeur et de chaleur. Cette inflammation varie d'étendue selon la dose injectée ou les réactions individuelles de l'animal. Elle peut se limiter à la surface d'une pièce de 5 francs. Parfois elle s'étend jusqu'au pied, d'une part, jusqu'à l'ombilic, de l'autre, l'inoculation étant faite à la partie interne de la cuisse. Dans aucun cas elle n'a donné lieu à une réaction des ganglions lymphatiques. Jamais elle n'a donné naissance à la production de pus.

A la section de la région injectée, on constate qu'il s'est formé sous la peau et dans le muscle un œdème gélatiniforme sanguinolent, d'où s'écoule une sérosité abondante, riche en germes inoculés. L'inflammation guérit en trois à cinq jours.

Par ingestion buccale, la pénétration du germe infectieux ne provoque aucun accident local, décelé par la clinique.

L'injection intrapéritonéale entraîne un état général grave dû à la péritonite et à l'intoxication massive par bactériolyse des bacilles. La symptomatologie générale se dégage ultérieurement par les séquelles caractéristiques quand la péritonite est en voie de guérison.

Fièvre. — Dans les cas d'injection sous-cutanée de doses fortes de cultures pures (1/2 cent. cube à 5 cent. cubes et plus) la maladie commence, quelques heures après l'inoculation, par une ascension thermique brusque et maxima de 40° à 41°5. Elle continue en plateau moins élevé pendant quatre à cinq jours, retombe à la normale et s'y maintient après quelques oscillations. Dans ces conditions, la fièvre, due à la lésion locale, à l'absorption de toxine au point d'inoculation, se confond avec la fièvre de la maladie générale. Elle fait corps avec elle. La période d'inoculation passe inaperçue.

Dans les cas d'injection sous-cutanée de doses faibles de culture pure (1/20e de cent. cube), du sang des malades, d'ingestion buccale ou stomacale, une première ascension thermique se produit, avec oscillations, pendant quarante-huit heures, le

maximum étant entre 40° et 42°. Puis la température redescend sensiblement à la normale pendant trente-six ou quarante-huit heures. Elle remonte du quatrième au cinquième jour pour donner un plateau de cinq jours environ avec des maxima très variables, suivant les cas, de 40°6, 41° et 42° pendant plusieurs jours consécutifs.

Quand les doses ingérées sont très faibles, la première ascension thermique ne se produit pas, la maladie se déclare du quatrième au cinquième jour.

Cette période de quatre à cinq jours correspond à la période d'incubation de la maladie expérimentale.

3° Anatomie pathologique macroscopique. — Deux cas à considérer : 1° lésions dans la phase aiguë de la maladie; 2° lésions plusieurs mois après la guérison de la maladie aiguë, l'animal succombant aux séquelles chroniques.

Dans les deux cas, le cadavre est extrêmement maigre, émacié. Pas d'épanchement dans la plèvre, le péricarde, le péritoine. Cœur dilaté, mou, flasque, contenant des caillots.

Les poumons surnagent entièrement quand on les plonge dans l'eau. Dans les cas aigus, des foyers hémorragiques de quelques millimètres de diamètre font une tache noirâtre sur le fond rosé de la masse pulmonaire. Dans les cas chroniques, les taches violacées résultant de l'organisation des foyers hémorragiques persistent.

Le foie n'est pas augmenté de volume. Dans les cas aigus, il est congestionné et marqué de taches blanchâtres. Dans les cas chroniques il est jaunâtre avec le dessin lobulaire très accusé. A la coupe, il a l'aspect d'un foie gras, jaune pâle et très friable.

La rate paraît normale dans les deux cas.

Les reins et les capsules surrénales sont congestionnés.

La vessie est distendue et pleine d'urine trouble.

Les ganglions mésentériques constituent dans les cas aigus des masses rouges, très congestionnés; dans les cas chroniques, de gros paquets très apparents en raison de la résorption des pelotons graisseux.

Rien de particulier dans l'aspect extérieur de l'estomac et du tube digestif dans les deux cas. Dans les cas aigus la muqueuse de l'estomac est normale, la muqueuse du duodénum, des segments antérieur et moyen de l'intestin grêle est congestionnée, un peu épaissie. A l'œil nu, on ne constate ni hémorragie, ni ulcérations. Dans les cas chroniques, la muqueuse a repris son aspect normal.

Dans les cas chroniques, l'état des muscles attire particulièrement l'attention. Ils présentent des altérations de la cachexie aqueuse des animaux : décoloration générale, infiltration de sérosité entre les plans musculaires et jusque dans la masse musculaire. La graisse a disparu pour être remplacée par un tissu cellulaire grisâtre et gorgé de sérosité. L'atrophie musculaire est générale, mais elle est accentuée surtout dans les membres postérieurs

et plus particulièrement dans les muscles adducteurs des cuisses. Le muscle psoas iliaque est réduit à un mince cordon mou et flasque.

4° Hématologie. — La maladie expérimentale du porcelet est caractérisée, au point de vue hématologique, par la leucopénie, une acidophilie importante et une myélocytose légère (myélocytes vrais et cellules d'irritation). Toutes deux sont précoces et tenaces. Peu de variations du taux des polymorphes amphophiles, du premier au cinquième jour, à partir duquel ces éléments diminuent progressivement jusqu'au déclin de la maladie. Les moyens et gros lymphocytes, au-dessous de leur chiffre normal jusqu'au cinquième jour, le dépassent ensuite. Quand l'animal résiste à l'infection, l'équilibre leucocytaire est rétabli au bout d'un mois.

Le tableau ci-dessous indique le détail de cette évolution.

Inoculation par voie digestive ou sous-cutanée.

	PORCELETS NEUFS 10 sujets	PORCELETS INOCULÉS (10 SUJETS)							
		après 24 h.	après 3 j.	après 5 j.	après 8 j.	après 10 j.	après 13 j.	après 16 j.	après 1 mois.
Moyens et gros lymphocytes.	56	45	38,5	52,5	52	61	65,5	51	54
Polymorphes amphophiles.	41	41,5	39,5	28,5	30,5	29,3	20,5	23	42
Polymorphes acidophiles.	3	11	20	16,5	16	9	14	18	3
Myélocytes et cellules d'irritation . . .	»	1,5	2	2,5	1,5	0,5	»	1	1

5° Anatomie et histologie pathologique. — *Inoculation par ingestion.* — L'inoculation par la voie digestive est le mode de contamination dont toutes les phases peuvent être exactement suivies.

Les lésions du tube digestif ont été étudiées chez des animaux sacrifiés respectivement quatre heures, vingt-quatre heures, et trois jours après le repas infectant, et sur un porcelet mort le neuvième jour.

1° Quatre heures après l'ingestion des cultures, on constate de l'hyperémie du duodénum et de l'intestin grêle sur plusieurs points. A ce niveau, le tissu cellulaire des villosités s'est enrichi de quelques lymphocytes et polymorphes acidophiles. On trouve également des macrophages chargés de pigment ocre. Les capillaires sont dilatés. Le tissu conjonctif périglandulaire participe aussi à la réaction et contient des leucocytes déjà nombreux. L'épithélium paraît intact.

Les coupes de la paroi stomacale ne révèlent rien de particulier. Les ganglions mésentériques ne sont pas augmentés de volume.

2° Vingt-quatre heures après l'ingestion, la réaction vasculaire et lymphoïde s'est accusée. On note de petites hémorragies de la sous-muqueuse. Lymphocytes et acidophiles se rencontrent dans les différentes tuniques, même au niveau de la muqueuse où ils s'insinuent entre les cellules épithéliales. Les follicules clos hypertrophiés sont le siège d'une prolifération active. L'épithélium glandulaire réagit également sur certains points.

Les ganglions mésentériques sont volumineux. On assiste à un début d'hémogénéisation. Pas d'hématies extravasées. Les polymorphes acidophiles sont nombreux. Leur dimension, la forme régulière et la petite taille de leurs granulations les distinguent nettement des leucocytes hématophages très rares à ce stade de l'ingestion.

3° Au troisième jour après l'inoculation, l'intestin grêle est congestionné sur presque toute son étendue. Le mésentère est injecté, les ganglions très gros. Au microscope, on constate une prolifération épithéliale et folliculaire extrêmement active, des hémorragies diffuses, de l'hématophagie et une infiltration lymphoïde intense.

Les ganglions mésentériques montrent des capillaires engorgés, dilatés, et de nombreux acidophiles. Les centres germinatifs s'effacent dans l'hyperplasie totale de l'organe.

4° Neuf jours après l'inoculation (cas mortel) la paroi intestinale apparaît épaissie à l'œil nu. Cet épaississement est dû à l'infiltration des éléments lymphoïdes (lymphocytes, acidophiles, macrophages et quelques labrocytes) et à l'hypertrophie des follicules clos. L'épithélium présente des solutions à continuité, véritables ulcérations, et de nombreux points de nécrose : noyaux pycnotiques, protoplasme acidophile.

Les ganglions sont énormes formant une chaîne continue le long du mésentère. Leur structure apparaît bouleversée par la rupture des capillaires et la formation de véritables lacs sanguins. Au milieu des hématies, on trouve de nombreux macrophages, des polymorphes acidophiles et basophiles. Un des ganglions examinés présentait une zone de chromatolyse très étendue avec capillaires énormes à parois encore intactes, dans un magma acidophile chargé de débris de noyaux de toutes tailles. De gros macrophages se trouvaient à la périphérie.

5° Examen des autres organes : foie, poumon, rate, rein, surrénales. Il a été fait sur des animaux sacrifiés vingt-quatre heures, trois jours, neuf jours, treize jours et dix-huit jours après l'inoculation, ainsi que sur le porcelet mort le neuvième jour.

Foie. — Quelle que soit la gravité de l'infection, le foie est toujours touché de bonne heure, ainsi que le prouvent la congestion des vaisseaux et l'infiltration leucocytaire. Les leucocytes, lymphocytes et acidophiles, à l'exclusion des polymorphes amphophiles, s'accumulent d'abord dans les espaces portes, puis envahissent quelques lobules dont les cellules subissent, en certains points, la dégénérescence granuleuse. Une prolifération active et des remaniements incessants réparent des lésions lorsque l'infection est légère. Mais lorsque la maladie se prolonge, l'afflux sanguin vient disloquer les travées hépatiques, les cellules comprimées se nécrosent et le lobule est détruit. De nombreux macrophages et polymorphes acidophiles président à son élimination. Nous n'avons pas observé de caryocinèse.

Poumons. — Au début, on constate de la dilatation des capillaires et la

présence de nombreux lymphocytes dans les parois alvéolaires et le tissu conjonctif péribronchique. Dans les cas graves, on note de la thrombose veineuse, de l'engorgement de tous les vaisseaux qui finissent par se rompre, dilatent les parois des alvéoles et peuvent même combler leurs lumières. Acidophiles et macrophages sont toujours nombreux dans les travées conjonctives et dans les exsudats bronchiques. L'épithélium des petites bronches est fréquemment desquamé.

Rate. — Congestionnée au début, elle tend à se scléroser dans les cas prolongés. Hyperplasie folliculaire, comblement du sinus, dilatation des capillaires. Même dans les infections graves ou prolongées, la macrophagie n'est jamais très intense. Les acidophiles sont toujours nombreux, les hémorragies parfois très abondantes, les polymorphes amphophiles absents.

Rein. — A la congestion du début font suite rapidement des lésions épithéliales des tubes urinifères d'abord, des glomérules ensuite : destruction de la bordure en brosse et des bâtonnets, dégénérescence granuleuse des cellules ou cytolise. En même temps, le tissu conjonctif interstitiel réagit : des cellules conjonctives réactivées s'adaptent à la macrophagie et englobent les débris cellulaires. A côté d'elles apparaissent des lymphocytes, des acidophiles, des hématies extravasées. Les lésions, limitées dans les cas légers, s'étendent dans les infections graves, les hémorragies compriment les tubes qui dégénèrent sans toutefois jamais présenter des cylindres, le syncytium des glomérules devient granuleux, ses noyaux entrent en pycnose, la capsule de Bowmann s'épaissit, le glomérule se nécrose et disparaît. Pas de caryocinèse apparente.

Capsule surrénale. — Cette glande est peu modifiée dans les infections atténuées. Des hémorragies étendues peuvent, dans certains cas, bouleverser sa structure assez profondément et déterminer la nécrose de nombreux éléments cellulaires. La zone corticale est toujours moins touchée que la zone médullaire plus riche en vaisseaux et où l'infiltration lymphoïde est des plus intenses.

En résumé, l'ingestion du microbe provoque chez le porcelet des lésions qui peuvent être schématisées de la façon suivante : pénétration à travers la muqueuse intestinale (duodénum et intestin grêle), réaction lymphoïde de l'organe puis des ganglions voisins, septicémie et généralisation de l'infection déterminant de l'hépatie parenchymateuse, de la broncho-pneumonie lobulaire, de la néphrite épithéliale, splénite et surrénalite. Ces réactions des organes varient d'intensité suivant la gravité de l'infection.

D. — Maladie expérimentale du lapin.

Les animaux inoculés réagissent vivement, mais la symptomatologie n'a pas la netteté de la maladie du porcelet.

Dès que la fièvre apparaît, l'animal se met en boule, le poil

hérissé, il cesse de manger. Pas de diarrhée. Matières fécales normales, sèches et dures. Les troubles nerveux se résument à une asthénie sans caractères spéciaux.

L'inoculation sous-cutanée reproduit la lésion locale décrite chez le porcelet. Pas de réaction ganglionnaire. Pas de pus.

L'injection intraveineuse entraîne une élévation thermique qui atteint en quelques heures 41° à 42°. Puis une défervescence brusque se produit, suivie d'une nouvelle ascension qui se développe en plateau pendant quatre à cinq jours. La maladie se termine par la mort entre un et six jours, ou par la guérison accompagnée d'ondulations thermiques pendant plusieurs semaines. L'injection intraveineuse apporte des exemples de passage très rapide du germe infectieux dans l'urine moins de vingt-quatre heures après l'inoculation et de la persistance de ce mode d'élimination jusqu'à la mort au sixième jour.

L'ingestion à la sonde, dans l'estomac, de cultures pures à la dose de 2 cent. cubes peut entraîner la mort après passage du microbe dans la circulation générale et envahissement des viscères, en moins de dix heures. Ce mode d'inoculation peut donner naissance à une maladie mortelle en sept jours après une incubation de quatre à cinq jours et une maladie aiguë de quarante-huit heures avec hyperthermie atteignant 42°.

La maladie expérimentale du lapin suffirait donc à prouver le rôle pathogène du microbe et sa pénétration dans l'organisme par les voies digestives.

E. — Maladie expérimentale de la souris.

La souris blanche est très sensible à tous les modes d'inoculation.

Quelques instants après l'inoculation, la souris cesse de grimper sur les parois de sa cage. Elle se met en boule, triste, le poil hérissé. Puis elle se montre inquiète, agitée. Les mouvements ont perdu leur souplesse naturelle. Elle est secouée de courts frissons. Elle ne mange plus. Bientôt elle se traîne péniblement ou reste inerte. Elle succombe entre six et vingt-quatre heures.

L'injection sous-cutanée détermine une lésion locale de

même nature que la lésion du porcelet et du lapin. Pas de réaction ganglionnaire. Pas de formation de pus.

A l'autopsie, tous les organes sont congestionnés. Par frottis, on constate qu'ils contiennent, tous, le microbe inoculé.

La mort survient régulièrement par injection sous-cutanée en dix-huit heures avec des doses variant de 1/10 de cent. cube à 1/40 de cent. cube; de 1/50 à 1/100 de cent. cube, la mort ne se produit plus que sur 50 p. 100 des animaux infectés.

Par ingestion à la pipette, une goutte de culture pure entraîne la mort en vingt-quatre heures.

F. — Maladie expérimentale du cobaye.

Le cobaye est très résistant. Il succombe cependant irrégulièrement par ingestion de 1 cent. cube de culture pure à la sonde dans l'estomac après sept jours de fièvre légère. Le microbe ingéré est retrouvé par frottis dans le poumon, le foie, la rate, les reins, les capsules surrénales.

G. — La toxine : Expérimentation.

La toxine utilisée est une endotoxine préparée suivant le procédé indiqué plus haut (première partie, D).

Porcelet. — Quel que soit le mode d'inoculation employé, les symptômes qui se manifestent sont identiques à ceux de la maladie expérimentale : accidents aigus rapides, lésions chroniques poursuivant leur évolution pendant de longs mois. La marche de la température est particulièrement accusée.

I. — Ingestion à la sonde œsophagienne de 10 à 15 cent. cubes. La température normale du porcelet étant de 39°9, elle s'élève à 41°7 sept heures après l'inoculation; elle oscille entre 40°7 et 41°2 entre la 7e et la 36e heure, retombe à 40° vers la 48e heure pour se fixer peu après à la normale.

Pendant toute la durée de la fièvre : frissons, malaise, inappétence, asthénie, phénomènes cessant après la chute de la température.

II. — Injection sous-cutanée de 5 cent. cubes. La température de 39°5 passe six à sept heures après l'inoculation à 41°, reste vingt-quatre heures à ce niveau et retombe à la 48e heure à la normale. Accidents aigus, frissons, malaise, inappétence, fatigue générale cessant après la chute de la température.

III. — Injection intracérébrale, sous-méningée, après trépanation de 1 cent. cube environ de toxine.

La température, avant l'inoculation, étant de 39° à 39°5, atteint trois heures après 41°, 7 heures après 42°, oscille entre 41° et 42° jusqu'à la 36e heure environ, puis tombe en quelques heures entre 40° et 39°5.

Accidents aigus de la plus haute gravité reproduisant la symptomatologie générale de la maladie. Après vingt-quatre heures, l'attitude caractéristique (rein voussé, jarret clos, position du rassemblé, écartement des onglons) est constituée. Trois terminaisons de la crise ont été observées : 1° mort quatre-vingt-seize heures après l'inoculation, soit à la fin du quatrième jour ; 2° guérison avec persistance de séquelles s'aggravant progressivement, reproduisant les formes les plus accentuées d'atrophie et de dégénérescence musculaire, et mort après trois mois, au dernier degré de la cachexie ; 3° guérison complète après quelques jours de maladie.

II. — Physiologie pathologique.

L'étude de la maladie expérimentale du porcelet permet de concevoir les conditions de l'infection.

1° Conditions dans lesquelles le microbe apparait dans les organismes infectés. — Dans la maladie expérimentale du porcelet, le microbe peut être isolé de la circulation générale. Très souvent l'hémoculture donne un résultat négatif. Si, au moment de sacrifier l'animal, on fait une nouvelle hémoculture par ponction du cœur, elle peut rester négative alors que, dix minutes après ce prélèvement du sang dans la circulation générale, les frottis des principaux organes : poumons, foie, rate, reins, capsules surrénales, montrent que le microbe est présent dans le parenchyme des viscères.

L'examen direct par étalement ou par gouttes épaisses sur lames, même après centrifugation, a toujours été négatif.

Il disparaît ou se raréfie très rapidement dans la circulation générale. Dans les organes, par frottis, on le trouve à partir de la quatrième heure jusqu'à la fin de la maladie qui survient de un à quinze jours après l'inoculation ou l'ingestion. Il semble donc que, très raréfié ou disparu de la circulation générale, il se multiplie dans les capillaires profonds des organes.

Le microbe occupe, dans l'intestin, la sous-muqueuse et les interstices des glandes; dans les ganglions, les sinus, surtout au voisinage de la capsule; dans le foie, en petit nombre, le sang extravasé au niveau des lobules en voie de destruction;

dans le rein, le tissu interstitiel, soit intertubulaire, soit au voisinage immédiat du glomérule; dans le poumon, les exsudats bronchiques, les parois et la lumière des alvéoles. La rate et les capsules surrénales sont très pauvres en bacilles.

L'examen des frottis et des coupes montre dans tous les cas que le germe infectieux a une vie extracellulaire, libre, en dehors des leucocytes et des cellules, soit isolé, soit par petits groupes.

Il est mobile dans les sucs organiques où il ne forme jamais de spores. Il se multiplie par scissiparité. Dans certains cas, on le retrouve dans les organes et plus particulièrement dans la rate aux divers stades de la bactériolyse, à côté des formes en voie de reproduction.

2° Voies de pénétration dans l'organisme. — Le fait que les premières observations de la maladie ont retenu l'attention, au mois de juin, d'une année de sécheresse, au moment de la pullulation des moustiques et de la réinfection paludéenne, a orienté les premières recherches dans le sens de la transmission de la maladie par les insectes piqueurs. Les résultats ont été négatifs.

L'expérimentation sur le porcelet permet d'apporter la preuve que l'infection se fait par la pénétration à travers la muqueuse de l'intestin, après ingestion par la voie buccale.

Si on fait effectuer par une série de porcelets de 4 kilogr. un repas infectant et que ces animaux soient sacrifiés à des intervalles déterminés, on constate ce qui suit : après quatre heures, les frottis d'organes montrent que le microbe ingéré a pénétré dans la circulation générale et dans les viscères. Dans l'estomac, qui n'a pas encore chassé le bol alimentaire entièrement, le microbe est en parfait état de conservation et en voie de multiplication. Dans le duodénum, il donne l'impression d'une culture à peu près pure. Le jéjunum et l'iléon ne contiennent pas de microbes décelables par frottis. Après vingt-quatre heures très peu de microbes dans l'estomac, un très grand nombre dans le duodénum, une assez grande quantité dans le jéjunum, très peu dans le gros intestin.

Au point de vue anatomo-pathologique, on constate une duodéno-entérite caractérisée par l'épaississement de la mu-

queuse infiltrée d'éléments lymphoïdes, l'hypertrophie des follicules, les solutions de continuité de l'épithélium, de nombreux points ulcérés et nécrosés. Les ganglions mésentériques sont énormes, formant une chaîne continue le long du mésentère. Leur structure apparaît bouleversée par la rupture des capillaires et la formation de véritables lacs sanguins.

Par frottis on a retrouvé le germe infectieux dans les principaux viscères. On constate sur les coupes de l'hépatite parenchymateuse, de la broncho-pneumonie lobulaire, de la néphrite épithéliale, de la splénite et de la surrénalite.

Les diverses étapes de la pénétration du microbe pathogène dans l'organisme par la voie digestive sont nettement marquées. Il semblerait que dans la maladie expérimentale, la moindre résistance du sujet à l'infection est causée par l'ingestion de doses élevées du germe infectieux, l'absorption consécutive de toxine, la dépression nerveuse et l'inhibition de la fonction hépatique.

3° Elimination du microbe de l'organisme. — Le microbe est éliminé de l'organisme par les reins, les poumons et le tube digestif.

On le retrouve fréquemment dans les urines prélevées aseptiquement au cours de la maladie. L'urine n'est jamais sanglante ni hémoglobinurique. Elle contient une petite quantité d'albumine et un taux très faible de chlorures. Les lésions épithéliales et interstitielles du rein, avec points hémorragiques et nécrose du glomérule, suffisent à expliquer le passage en grande abondance des microbes en plein développement et doués de toute leur mobilité.

Le microbe peut être isolé par frottis de gorge. On objectera, dans ce cas, qu'il provient de souillures extérieures. Mais les lésions pulmonaires sont constantes : suffusions sanguines à l'œil nu, correspondant à la rupture des capillaires dans les alvéoles.

Le parasite est fréquent dans les selles de l'homme et des animaux sains. Cette constatation n'a rien de surprenant, puisqu'il se trouve en abondance dans le riz. Après l'ingestion des repas infectants on suit la culture et l'élimination du germe infectieux dans les voies digestives.

4° Mode d'action. — Dans les cas d'injection sous-cutanée à doses faibles du sang des malades, d'ingestion buccale et stomacale, la maladie se déclare au quatrième ou au cinquième jour après l'introduction du germe infectieux dans l'organisme. Cette période de quatre à cinq jours correspond à l'incubation de la maladie expérimentale du porcelet.

Le germe infectieux séjourne dans les capillaires profondes des viscères. Cette infection est fort réduite si on la compare à la pullulation des microbes doués d'une grande virulence.

Dans l'infection par voie péritonéale, les doses massives de microbes sont rapidement détruites dans l'épanchement péritonéal qui succède à l'injection, les symptômes les plus graves apparaissent très rapidement. L'autopsie, pratiquée aussitôt, montre très peu ou pas du tout de germes infectieux dans les viscères.

De même l'inoculation intracérébrale de toxine pure réalise d'emblée la symptomatologie la plus grave.

En somme, la maladie expérimentale du porcelet est une toxi-infection dans laquelle les phénomènes toxiques sont dominants. La toxine mise en liberté provient des germes circulant dans le sang et des bacilles qui cultivent abondamment dans le tube digestif.

Ce sont les symptômes nerveux, la myalgie, l'asthénie profonde, l'inquiétude, l'hypotonicité musculaire, qui donnent à la maladie sa physionomie propre. Chez le porcelet, cette hypotonicité musculaire, transitoire dans les cas bénins, aboutit à l'atrophie musculaire et à l'infiltration aqueuse par dégénérescence de la fibre musculaire dans les cas graves.

La démonstration est faite par l'étude de la physiologie pathologique de la maladie expérimentale du porcelet que *le microbe, isolé du sang de l'homme dans des états pathologiques déterminés, manifeste un pouvoir toxigène accentué et une virulence faible dans la circulation générale des organismes atteints. Il produit une maladie toxi-infectieuse transmissible par les aliments et à point de départ gastro-intestinal.*

CONCLUSION

L'étude qui précède établit un certain nombre de faits d'observation et suggère quelques hypothèses.

Un microbe, *Bacillus asthenogenes*, est isolé du sang de l'homme au cours de fièvres indéterminées de Cochinchine; il permet d'établir la symptomatologie de ces états fébriles. Ce germe est retrouvé à l'autopsie, dans les viscères et dans l'urine de deux sujets décédés, après avoir été isolé par hémoculture au cours de la maladie. La réaction de fixation du complément est positive dans les cas graves de l'affection.

Ce bacille donne au porcelet une maladie expérimentale, qui, dans ses formes bénignes et moyennes, reproduit les symptômes principaux de la maladie humaine. La maladie expérimentale permet d'établir le mode de pénétration du germe infectieux par la voie digestive, sa répartition tissulaire, ses voies d'élimination et son mode d'action. Il tue en outre la souris et le lapin.

On peut donc conclure nettement que ce microbe est pathogène.

Est-il l'agent de la maladie de l'homme correspondant à la symptomatologie décrite? Est-il seulement un microbe associé ou un microbe de sortie sous la dépendance d'un autre germe, véritablement spécifique? Bien que l'ensemble des faits acquis soit favorable à sa spécificité, la question reste ouverte à de nouvelles recherches.

La maladie décrite rentre-t-elle dans le cadre des maladies climatiques connues, est-elle une entité morbide méconnue? Le caractère arbitraire des distinctions entre les fièvres climatiques du pays subordonne la conclusion à une observation plus prolongée. C'est ce qui justifie l'appellation provisoire de « fièvre asthéno-myalgique » proposée pour cette affection.

La maladie expérimentale du porcelet comporte, outre les formes bénignes et moyennes, des formes graves suivies de guérison avec séquelles d'atrophies musculaires incurables et progressives. Ces formes graves existent-elles chez l'homme? L'observation, dans quelques cas, de troubles passagers de la

motricité, consécutifs à la fièvre asthéno-myalgique, permet de supposer que des séquelles plus sévères peuvent se présenter. Si cette hypothèse est fondée, il est vraisemblable qu'elles ne sont pas rattachées à une maladie fébrile initiale passée inaperçue. Il se peut qu'elles viennent grossir le groupe si confus des troubles chroniques de la motricité que la terminologie médicale englobe sous le nom de béribéri. En tout cas, la question des formes graves de la maladie humaine mérite d'être posée.

L'examen de ces suggestions rentre dans le programme des recherches en cours.

(Travail de l'Institut Pasteur de Saïgon.)

SUR LES MYXOBACTÉRIES

par P. E. PINOY.

(Avec la planche IV.)

Depuis que Thaxter, en 1892, a mis nettement en évidence le groupe des Myxobactéries, plusieurs travaux ont été publiés mettant en doute leur existence, mais Thaxter n'eut pas de peine à démontrer que les auteurs n'avaient jamais eu en mains de véritables Myxobactéries et qu'ils avaient pris pour telles des associations de champignons et de bactéries. En particulier, Zederbauer avait considéré comme *Chondromyces glomerosus* l'état conidien du *Coryne sarcoides* Tul, décrit par Fries sous le nom de *Tremella sarcoides* et bien connu des mycologistes.

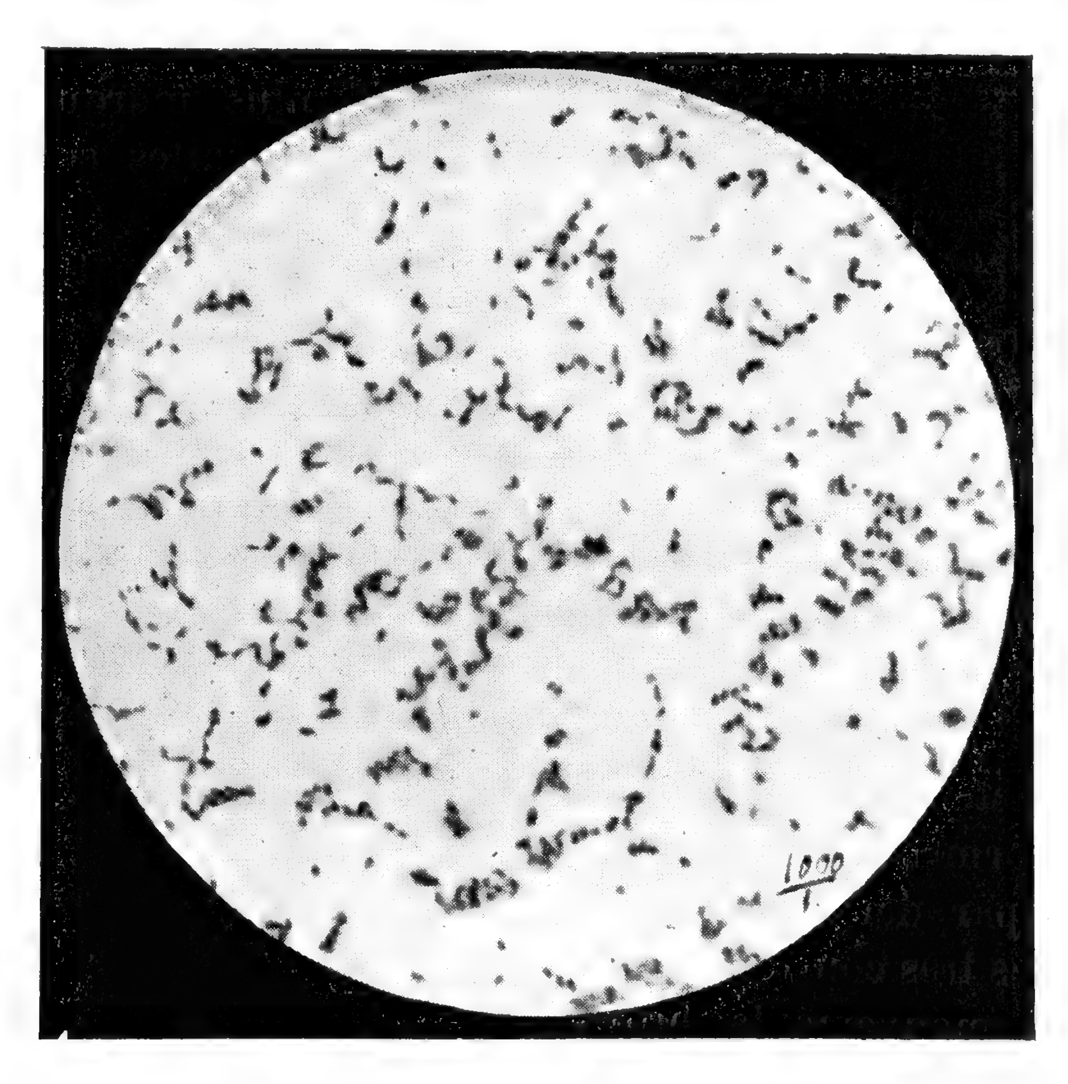


FIG. 1. — Culture de *Micrococcus luteus*.

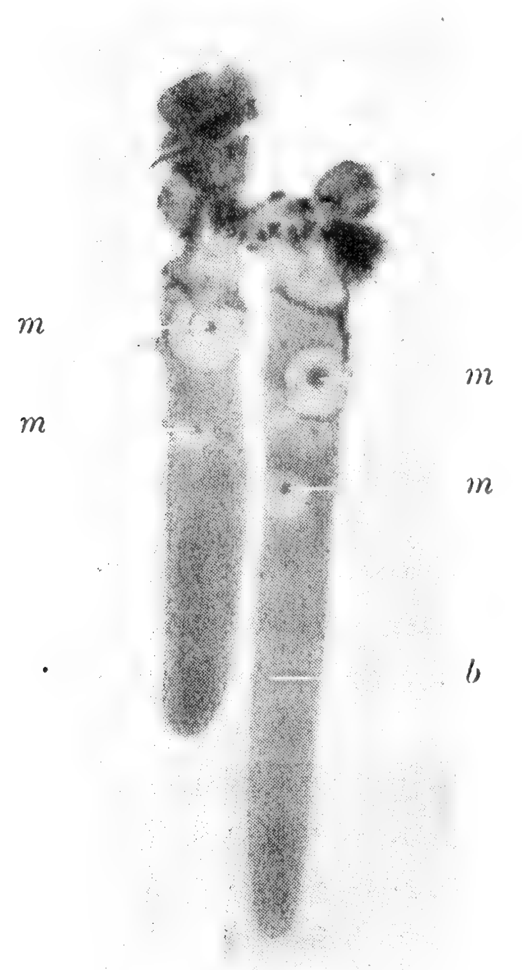


Fig. 2. — Taches claires (*m*) formées par la Myxobactérie sur la strie (*b*) bactérienne.

Vahle, au contraire, a donné une bonne étude de quelques Myxobactéries. Une observation faite par lui sur *Chondromyces crocatus*, espèce d'un genre très évolué de Myxobactéries, m'a engagé à reprendre l'étude biologique de cette espèce. En effet cet auteur constate qu'en culture pure (?) *Chondromyces crocatus* ne se développe que faiblement, tandis qu'on obtient un grand développement sur les milieux non stérilisés par chauffage. « En ensemençant en même temps *Bacillus oxalaticus* sur milieu stérilisé, on obtient un développement végétatif plus marqué, mais les fructifications produites sont anomales. »

En employant la même technique qui m'avait servi pour l'étude des Acrasiées, j'ai obtenu des cultures de cet organisme et j'ai constaté que la condition *sine qua non* pour obtenir son développement complet est qu'il soit associé à une bactérie particulière. — Cette bactérie (fig. 1) est un *Micrococcus* voisin de *Micrococcus luteus*. Ses caractères sont les suivants : formes coccus souvent réunies par deux ou formes bacillaires très courtes, immobiles ou mouvements browniens ; prend le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, trouble le bouillon et donne ensuite un voile à sa surface, donne sur pomme de terre un enduit jaune citron et sur gélose une strie blanc jaunâtre.

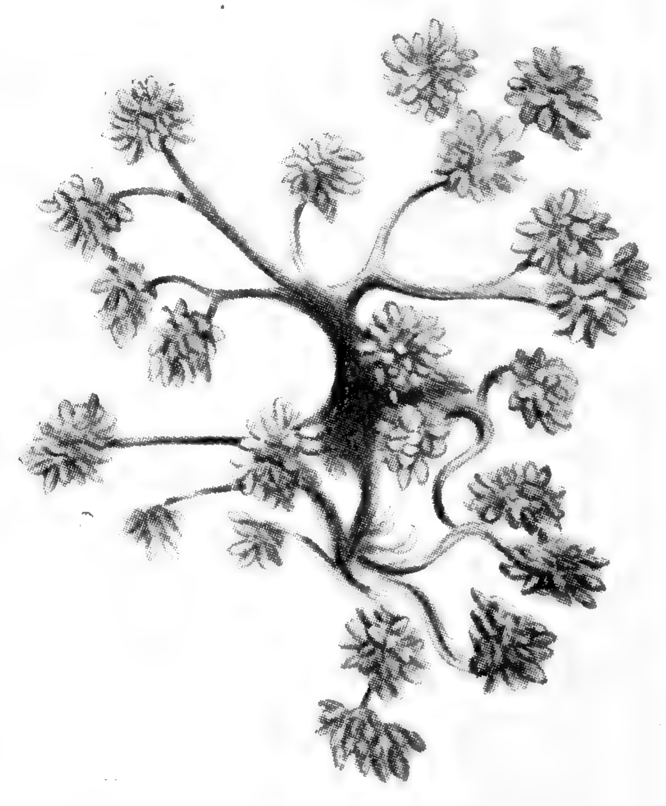


Fig. 3. — Fructification (faible grossissement : 60/1).

En association avec cette

bactérie, *C. crocatus* se développe non seulement sur son substratum naturel, le fumier, mais aussi sur gélose au lait, sur gélose à la graine de lin, milieux stérilisés à 115° et préparés suivant la technique que j'ai indiquée dans mon travail sur les Myxomycètes.

Si, sur la surface de la gélose (gélose à la graine de lin par

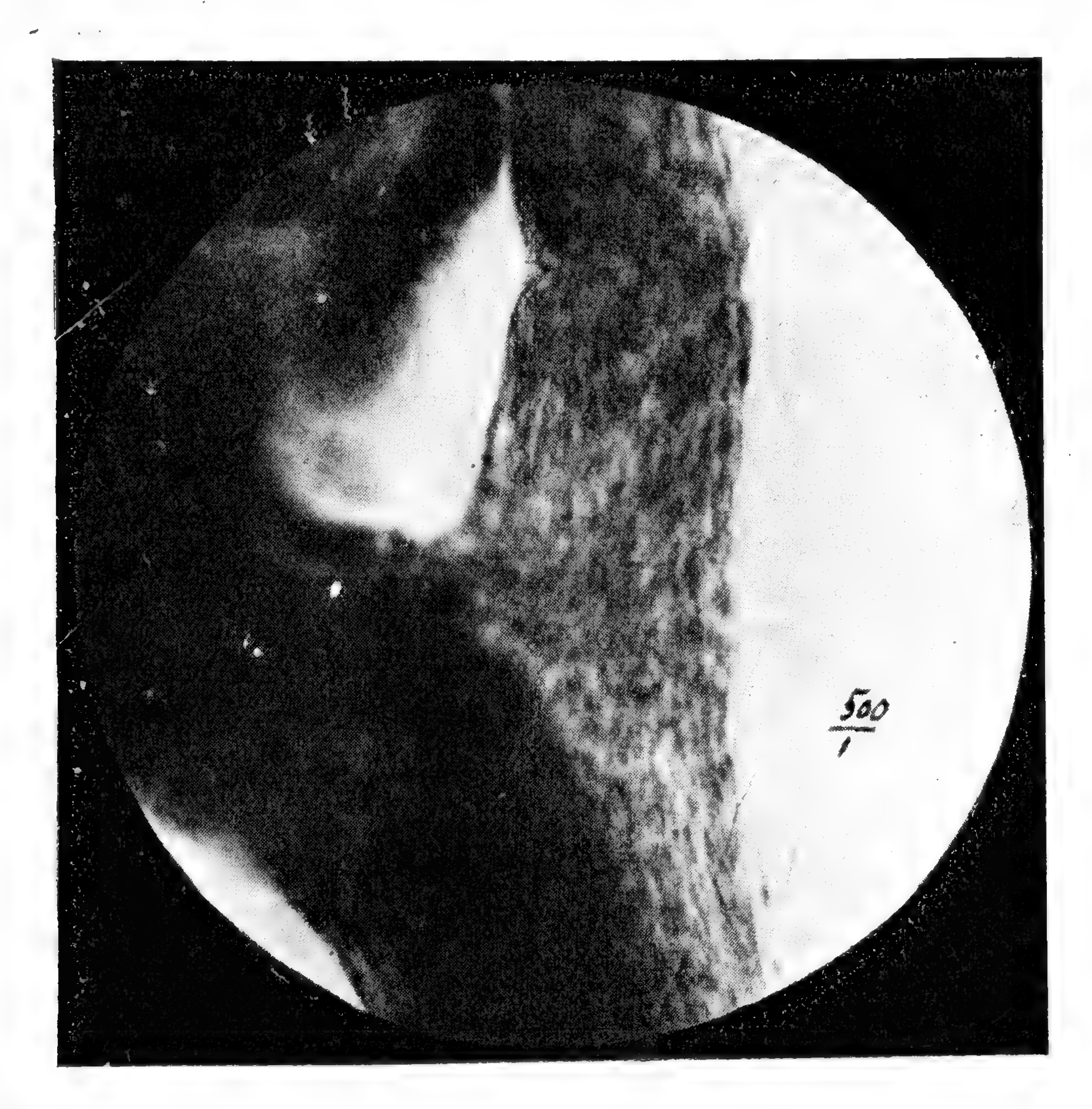


Fig. 4. — Formation du pied d'une fructification.

exemple), contenue dans une grande boîte triangulaire, on ensemence par stries simultanément les kystes de la Myxobactérie et le *Micrococcus*, on constate que la bactérie se développe d'abord en donnant des traînées opaques jaune blanchâtre, puis au milieu de ces traînées apparaissent, au bout de trois à quatre jours, des taches claires, transparentes, circulaires à bord surélevé qui envahissent progressivement la culture de *Micrococcus* (fig. 2). Les taches claires sont formées par la Myxobactérie qui a solubilisé les *Micrococcus* dans les points où elle s'est développée. Le bord de la tache est surélevé par suite

de l'amoncellement des éléments végétatifs de la Myxobactérie.

Ceux-ci sont représentés par des bâtonnets à bouts arrondis de 3 μ à 8 μ de long sur 0 μ 6 à 0 μ 8 de large. Ils ne prennent pas le Gram et se colorent bien par tous les colorants basiques. Avec les colorants à la thionine, à l'hématoxyline, on voit au centre un ou deux corpuscules fortement colorés, situés entre



Fig. 5. — Formation du kyste.

deux espaces clairs. Examinés dans une gouttelette d'eau, en goutte pendante, à l'état vivant, ces éléments paraissent animés d'un mouvement oscillatoire. Leur mouvement de progression est dû vraisemblablement à leur adhérence sur le substratum, il s'agirait d'une reptation. Ils se groupent en lignes, sécrètent autour d'eux une substance unissante particulière et forment des filaments plus ou moins épais. Certains de ces filaments peuvent pénétrer dans la gélose et s'étendre au delà des traînées de la culture du *Micrococcus*. Au bout d'un temps variable, dépendant des conditions extérieures, température, humidité,

généralement au bout de huit à quinze jours, les appareils de fructification se forment soit sur le bord, soit au centre des taches. Ils sont d'ordinaire plus nombreux sur les bords. Les fructifications sont d'un jaune orangé vif (fig. 3). La plus simple est constituée par le groupement des filaments végétatifs en



Fig. 6. — Fructification montrant la disposition des kystes (grossissement : 180/1).

un amas qui se différencie en un pied et une tête arrondie. La substance unissante jaune enrobant les filaments qui forment le pied (fig. 4) se durcit en même temps que de la tête sortent dans toutes les directions des filaments de bactéries alignées qui s'entourent bientôt de la même substance, de manière à constituer des kystes de forme parfaitement définie (fig. 5). Les kystes sont ovoïdes. Une extrémité est arrondie et l'autre est terminée par une pointe courte qui les fixe sur la tête. Ils sont

rangés autour de la tête comme les stérigmates chez les *Aspergillus* (fig. 6). Les fructifications sont le plus souvent composées. Le pied s'est ramifié au point de donner un arbuscule dont chaque branche porte à son extrémité un groupe de kystes.

De manière à pouvoir étudier les formes bactériennes du *Chondromyces crocatus*, sans risquer d'attribuer à cette espèce des formes appartenant à une bactérie étrangère, j'ai cherché

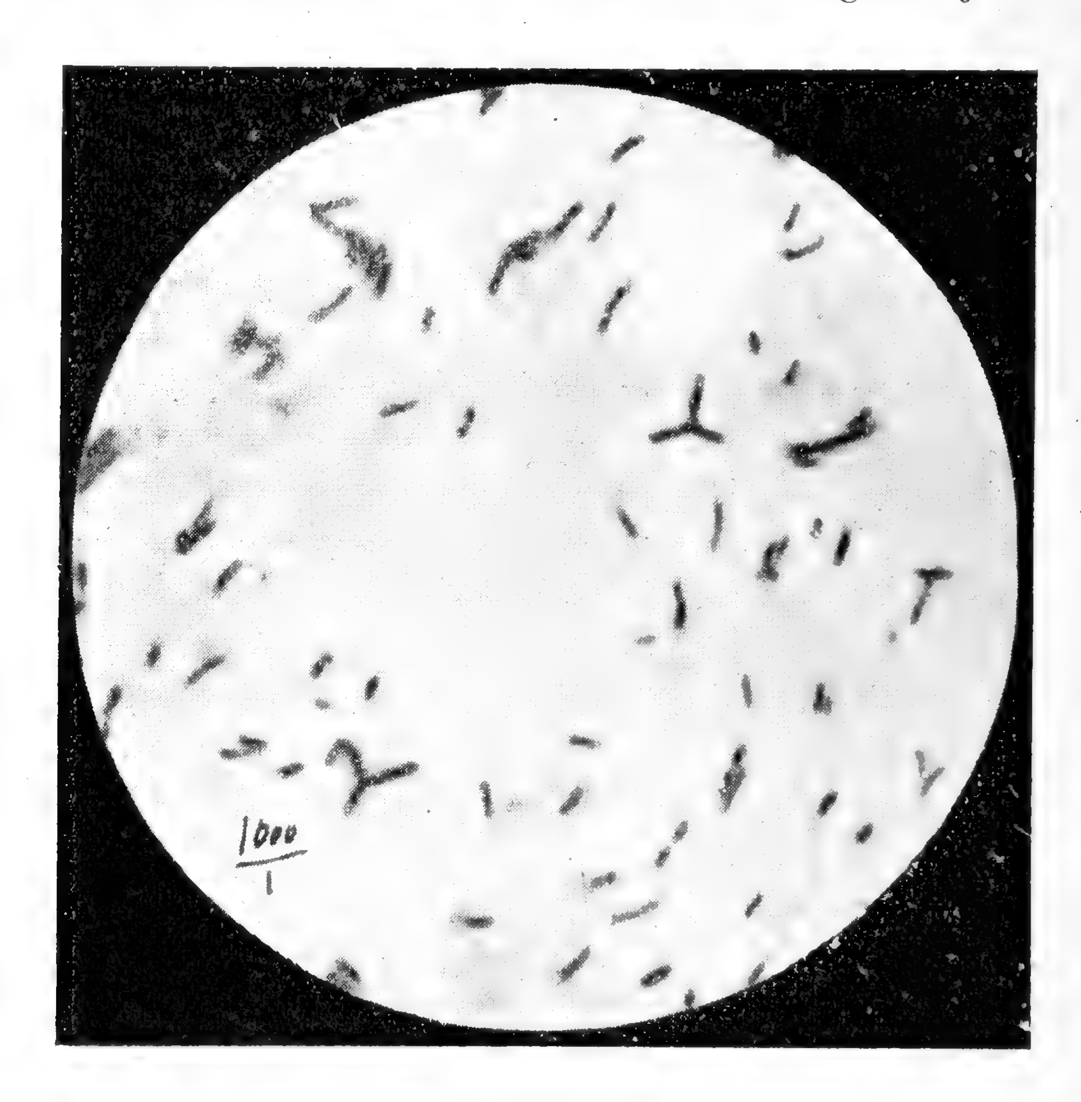


Fig. 7. — Eléments végétatifs de la Myxobactérie.

à l'obtenir en culture pure. J'ai obtenu ce résultat en cultivant le *Micrococcus luteus* sur de la gélose à la graine de lin, faisant un extrait chloroformique de la culture ainsi obtenue et l'ajoutant au milieu sur lequel j'ensemençais les kystes de *Chondromyces*. Dans ces conditions, j'ai constaté parmi les formes végétatives de la Myxobactérie l'existence d'un grand nombre de formes en y, semblables à celles des bactéroïdes des nodosités des Légumineuses (fig. 7).

Ce n'est pas là d'ailleurs le seul point de similitude entre les Myxobactéries et les bactéries des Légumineuses. Les bactéroïdes donnent en effet, à l'intérieur des nodosités, des fila-

ments formés par des bactéries enrobées dans une substance unissante qui a les mêmes propriétés chimiques que celle du *Chondromyces crocatus*. Elle résiste à la potasse et se colore en jaune par l'iode. Les suçoirs qui pénètrent dans l'intérieur des cellules, et qui ont été représentés par plusieurs auteurs, res-

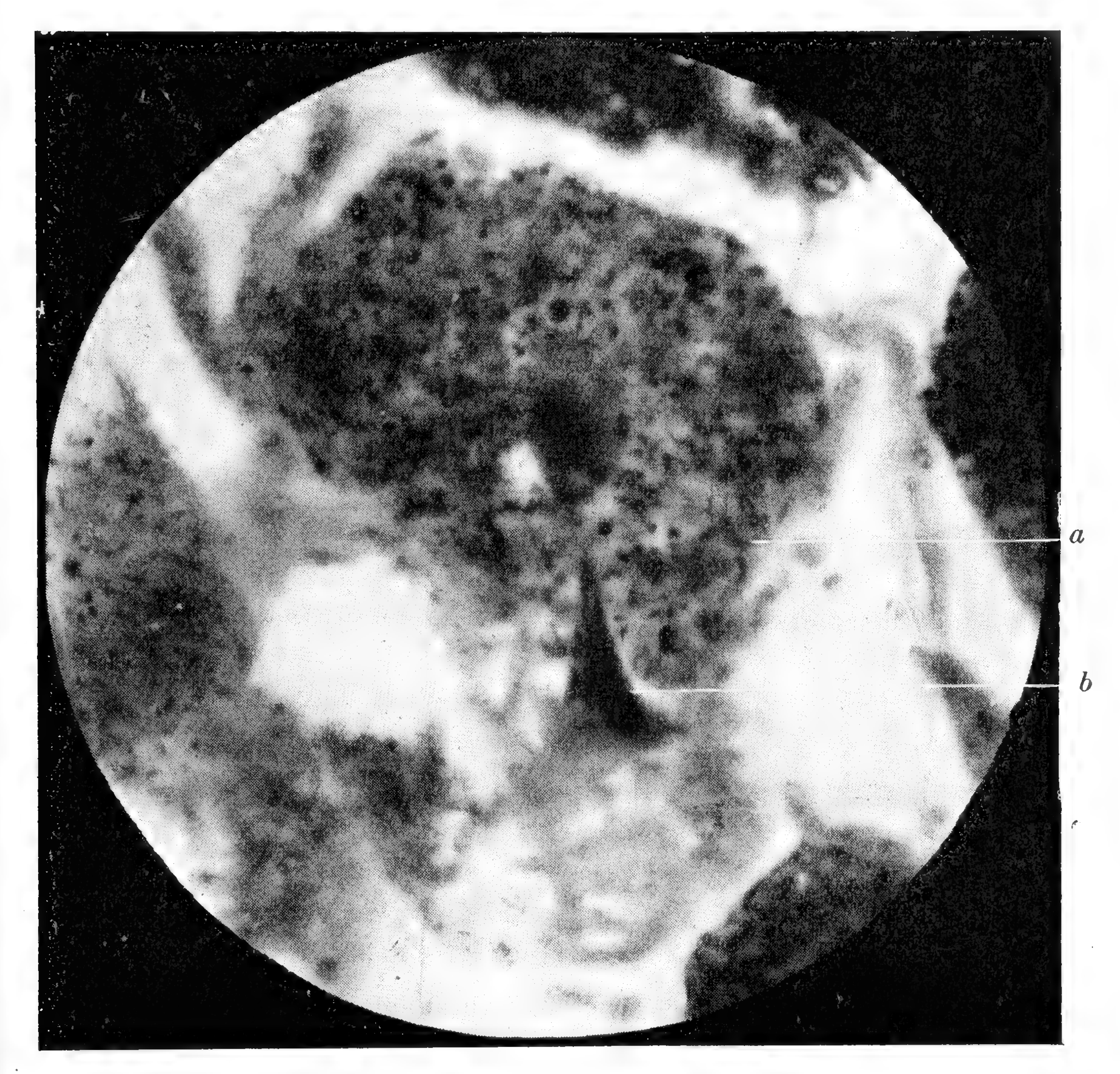


FIG. 8. — Photographie d'une cellule (*a*) de nodosité de pois pénétrée par les bactéroïdes (*b*).

semblent beaucoup aux kystes myxobactériens. La photographie d'une coupe de nodosité de pois montre la disposition des bactéroïdes pénétrant dans une cellule (fig. 8).

Au cours de nos cultures, nous avons obtenu, par suite de l'addition de bactéries étrangères (B. *fluorescens*, B. *pyocyaneus*) des formes anomales. La plus intéressante est celle qui a été représentée (fig. 9). Les kystes se sont produits successivement aux dépens de filaments provenant du pied, ils se sont disposés

en chapelets. Cette forme se rapproche beaucoup du *Chondromyces catenulatus* Thaxter. La perte des cultures pendant la guerre m'a empêché de savoir si cette forme pouvait être fixée. Ce point particulier eût été important à étudier, nous aurions eu l'exemple d'une mutation dont nous connaissions la cause.

Les Myxobactéries existent souvent dans les matières fécales,



Fig. 9. — Fructification anomale.

et Chatton a obtenu, à partir des excréments de singe, une culture de Myxobactérie qu'il m'a apportée. Il s'agissait du *Myxococcus ruber*. Je l'ai conservé longtemps en culture avec une bactérie fluorescente. Les *Myxococcus* sont des Myxobactéries très simples. Dans ce genre l'amas qui constitue la fructification se subdivise en masses plus ou moins sphériques. A l'intérieur de ces masses, qui équivalent aux kystes de *Chondromyces crocatus*, chaque bactérie se transforme en une spore. Cette formation est analogue à celle des Guttulinacées chez qui les amibes rassemblées en amas se transforment chacune en spores.

C'est pourquoi Vahle voudrait placer les Myxobactéries dans le groupe des Myxomycètes. Il est certain que pour former les fructifications les Myxobactéries se disposent en traînées et se groupent comme les myxamibes des Acrasiées. Ce n'est pas parce qu'une colonie d'algues prend le même aspect qu'une colonie de protozoaires, que l'on doit conclure qu'une algue est un protozoaire.

Les Myxobactéries sont des bactéries qui donnent des colonies très différenciées. Cette différenciation est due sans doute à leur vie symbiotique avec une autre espèce bactérienne. Les kystes des Myxobactéries sont comparables aux amas des staphylocoques dans la Botryomycose. Enfin la Bactérie qui provoque la formation des nodosités des racines des Légumineuses est une Myxobactérie. Le terme le plus juste pour désigner les Myxobactéries serait celui de Synbactéries.

BIBLIOGRAPHIE

THAXTER. — On the Myxobacteriaceæ, a new order of Schizomycetes. *Bot gaz.*, p. 389, 1892.

— Further observations on the Myxobacteriaceæ, *Bot. gaz.*, p. 395, 1897.

— Notes on the Myxobacteriaceæ, *Bot. gaz.*, p. 405, 1904.

C. VAHLE. — Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakterien und Bakteriazeen, sowie die Rhodobakteriazeen une Spirillazeen. *Centralbl.* 2e partie, **25**, p. 178, 1910.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Août — N° 8.

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE M. PASTEUR

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . . . France . . . . 45 fr.
— — — — . . . . . . Union Postale. 55 fr.
Prix du numéro, — — . . . . 4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées.
Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément.
Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 8

Mémoires publiés à l'occasion du Jubilé de Élie Metchnikoff, réunis un volume grand in-8° de 724 pages et 20 pl. en noir et en couleurs, précédés compte rendu du Jubilé du 16 mai 1915, avec portrait de E. Metchnikoff. — Pa Masson et Cie, 50 francs.

35e ANNÉE AOUT 1921 N° 8

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LES SUBSTANCES BACTÉRIOLYTIQUES DES LEUCOCYTES ET LEURS RAPPORTS AVEC L'ALEXINE (1)

par le Dr GENGOU

(Institut Pasteur de Bruxelles).

La découverte de la phagocytose et de la destruction de certaines bactéries à l'intérieur des globules blancs a suscité, depuis les travaux de Metchnikoff, de nombreuses recherches sur la nature et les propriétés des substances actives des leucocytes.

La plupart de ces travaux ont eu, en outre, pour objet d'établir les rapports existant entre ces substances et l'alexine (2).

On s'est efforcé, en soumettant les globules blancs à divers traitements (macération à différentes températures et dans divers liquides, congélation, broyage avec des substances inertes, etc.), de retirer les matières auxquelles ils doivent leur pouvoir de détruire dans leur protoplasma les bactéries ingérées.

(1) Les expériences décrites dans cette note ont été faites en 1915 et n'ont pu être publiées jusqu'ici. La plupart de leurs résultats ont été signalés par Bordet : *L'immunité dans les maladies infectieuses*, Masson, 1920.

(2) Levaditi a analysé les travaux relatifs à ces questions dans une revue à laquelle, pour ne pas allonger cet exposé, nous renvoyons le lecteur. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1914.

On a obtenu de la sorte des extraits qui se sont montrés capables, en effet, de tuer certaines bactéries. De ce pouvoir bactéricide des extraits, on a conclu qu'ils renferment réellement les substances antimicrobiennes mêmes des leucocytes, dans l'état où elles se trouvent dans le protoplasma cellulaire.

Cette conclusion n'est pas admise, il est vrai, par tous. D'après Selter (1), les substances leucocytaires étudiées jusqu'ici ne seraient, pour Pfeiffer (2), que des produits artificiels formés lors des manipulations infligées aux leucocytes.

Sans doute cette allégation ne peut-elle être envisagée que comme une hypothèse dépourvue de preuves. Mais il faut bien reconnaître que les expérimentateurs qui ont assimilé les principes bactéricides des extraits leucocytaires étudiés par eux aux substances agissant dans l'intérieur même du globule blanc en vie, ne se sont guère préoccupés d'établir cette identité sur des bases irréfutables.

La mort d'un microbe peut être due en effet à des agents bien différents. Elle constitue donc difficilement un critérium absolu de l'identité des agents auxquels des milieux microbicides divers doivent leur pouvoir.

D'autre part, la propriété bactéricide d'une substance déterminée est habituellement démontrée par la méthode des plaques, c'est-à-dire par le dénombrement des colonies obtenues dans un milieu nutritif, tel que la gélose, ensemencé d'une émulsion microbienne soumise au préalable, pendant un temps déterminé, à l'action de la substance en expérience. C'est cette méthode qui a été utilisée jusqu'ici dans tous les travaux ayant trait à l'action bactéricide des extraits leucocytaires. Or, ceux-ci ont aussi la propriété d'agglutiner les bactéries. La diminution du nombre de colonies due à l'action d'un extrait leucocytaire, qui est toujours imputée à son pouvoir microbicide, résulte donc, en partie au moins, de l'agglutination bactérienne; on n'en tient cependant pas compte. Enfin, les bactéries qui succombent dans le protoplasme leucocytaire y subissent au préalable une transformation morphologique caractéristique : le vibrion cholérique, le bacille pyocyanique, par exemple, pren-

(1) Selter. *Zeitschr. f. Immunität.*, 1920, **30**, fasc. 2, p. 119.
(2) Friedberger et Pfeiffer. *Lehrbuch der Mikrobiologie*, Iena, 1919, p. 189.

nent, avant de disparaître, la forme de granules, dont les propriétés vis-à-vis des couleurs se modifient au fur et à mesure que se prolonge leur séjour intracellulaire. Or, cette transformation caractéristique n'a jamais été signalée dans l'action des extraits leucocytaires sur les espèces bactériennes qui la montrent, quand elles se trouvent à l'intérieur des globules blancs.

Ces remarques nous ont incité à chercher une méthode de traitement des globules blancs, fournissant des extraits susceptibles d'imprimer cette transformation aux bactéries. Un extrait jouissant de cette propriété pourrait évidemment être considéré comme renfermant les substances leucocytaires, dans l'état qu'elles possèdent dans le phagocyte. Il permettrait en outre d'en étudier les propriétés, sans recourir à la mesure de son pouvoir bactéricide par la méthode des plaques (1).

Il permettrait enfin une comparaison, plus sûre que celle qu'on a pu faire jusqu'ici, des principes bactériolytiques des leucocytes et de l'alexine.

En effet, la transformation intraleucocytaire des microbes en granules est identique, dans son aspect, à celle que subissent certaines espèces bactériennes sous l'influence de l'alexine. Ce fait constitue même l'un des arguments invoqués par certains auteurs, pour conclure à l'analogie de l'alexine et des substances bactéricides des globules blancs.

Or, la plupart des expérimentateurs qui ont analysé les propriétés des extraits leucocytaires se sont aussi attachés à l'étude de l'identité de l'alexine et des substances leucocytaires. La plupart d'entre eux ont conclu qu'il s'agit d'éléments différents.

Cette conclusion prête le flanc à la critique, car, pour comparer les propriétés de l'alexine à celles des substances bactéricides des leucocytes, il importe évidemment d'utiliser des extraits cellulaires capables, comme les leucocytes eux-mêmes, de transformer des bactéries en granules. Or, ainsi que nous venons de le dire, cette condition n'a pas été remplie jusqu'ici.

(1) Turro vient d'obtenir, comme nous en 1915, mais par une méthode différente de la nôtre, des extraits cellulaires transformant également le vibrion cholérique en granule. *Soc. de Biol.*, 1921.

*
* *

On peut extraire les substances bactériolytiques des globules blancs, en traitant ceux-ci par un acide dilué, puis en neutralisant exactement le liquide obtenu, débarrassé au préalable des cellules.

Expérience. — Ayant prélevé et citraté l'exsudat obtenu par injection intrapleurale de bouillon à un lapin, on en soumet les leucocytes à des lavages répétés au liquide de Ringer, puis on les délaie dans un volume tel de ce liquide que l'émulsion (A) renferme environ 40.000 leucocytes par millimètre cube.

Après nouvelle centrifugation, le sédiment de leucocytes est délayé dans un volume d'acide chlorhydrique centinormal, égal à 2-2,5 fois le volume de l'émulsion A. Le mélange est mis à une température de 6-8°, pendant une heure au minimum, puis centrifugé.

On neutralise le liquide aussi exactement que possible par une solution centinormale de soude. Cette neutralisation provoque la formation lente d'un précipité, dont on se débarrasse par centrifugation. Le liquide surnageant constitue l'extrait leucocytaire.

Ce liquide, à peine opalescent, possède la propriété de transformer en granules le vibrion cholérique. On introduit dans une série de tubes des volumes croissants d'extrait (0 c. c. 1 à 0 c. c. 6); on ramène, dans chacun, le volume à 0 c. c. 6 par addition d'eau physiologique; puis on additionne chaque tube de 0 c. c. 1 d'une émulsion cholérique (une culture de dix-huit heures sur gélose délayée dans 20 à 30 cent. cubes d'eau physiologique). Après un séjour d'une heure à 37°, la transformation des vibrions en granules est complète dans les tubes contenant 0 c. c. 3 à 0 c. c. 6 d'extrait, de moins en moins marquée au fur et à mesure que la dose d'extrait est plus faible.

Nous nous sommes habituellement servi, pour faire nos extraits, d'acide chlorhydrique. Cependant nous avons obtenu des résultats positifs en employant des solutions d'acide lactique en concentration de 1 p. 1.000 à 1 p. 100.

Il se pourrait donc que la nature de l'acide employé fût, dans une certaine mesure, indifférente.

L'acide doit rester au moins une heure au contact des globules blancs; mais son action peut être prolongée sans inconvénient pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures. Nous avons même souvent conservé pendant des semaines en milieu acide, tout comme en milieu neutre, nos extraits leucocytaires.

Par contre, il n'est pas indifférent de faire agir l'acide dilué sur les cellules à n'importe quelle température : tandis que nos

recherches ont été régulièrement positives en opérant entre 5 et 20°, les extraits obtenus entre 23 et 37° se sont montrés d'autant moins actifs que la température d'extraction était plus élevée.

En observant cette technique, nous avons pu extraire les substances actives même aux dépens de leucocytes séchés et conservés plusieurs jours dans cet état.

Par contre, les leucocytes chauffés à 55° pendant trente minutes, ou traités par l'alcool sans dessiccation préalable, ne nous ont donné que des extraits inactifs.

Nous avons obtenu des résultats analogues en nous servant de leucocytes de cobaye. Toutefois, il faut recourir dans ce cas à une solution décinormale (d'acide chlorhydrique, par exemple).

Ajoutons que nous n'avons jamais pu obtenir d'extraits actifs aux dépens de globules rouges, de plaquettes sanguines ou de cellules spléniques. De même, les résultats ne sont positifs que si l'on emploie des exsudats jeunes constitués de leucocytes polynucléaires. Lorsqu'on retire les exsudats de la cavité pleurale du lapin plusieurs jours après leur production, ils renferment une proportion de plus en plus considérable de mononucléaires. Ces exsudats ne nous ont jamais donné d'extrait capable de transformer en granules les bactéries, qui subissent cette modification morphologique à l'intérieur des leucocytes à noyau polymorphe.

Si on soumet des quantités identiques de leucocytes polynucléaires de lapin soit à l'action d'un acide dilué, comme dans l'expérience relatée ci-dessus, soit à la congélation, ou à la macération à diverses températures dans de l'eau physiologique, on n'obtient d'extrait capable d'imprimer au vibrion cholérique la transformation signalée par Metchnikoff que par l'intervention d'un milieu acide.

On pourrait émettre l'hypothèse que les procédés d'extraction qui ne fournissent pas de liquide actif retirent néanmoins les substances leucocytaires, mais dans un état latent, et que l'intervention d'un acide est nécessaire à leur activation. On peut démontrer qu'il n'en est rien. Si on ajoute à un extrait obtenu par la macération de leucocytes dans l'eau physiologique à 37° ou à 55°, ou par la congélation, une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour obtenir dans le liquide une solu-

tion centinormale d'acide, l'extrait, neutralisé après une ou plusieurs heures, se montre absolument incapable de transformer en granule le vibrion cholérique. Il en est encore ainsi, si l'on obtient l'extrait leucocytaire par la méthode de Fiessinger ou celle de Jochmann.

On peut dès lors, semble-t-il, admettre que, dans le procédé d'extraction que nous avons employé, l'acide n'a pas pour effet de rendre actives des substances qui, tout en étant parfaitement dissoutes dans l'intérieur du leucocyte, s'y trouveraient cependant dans un état préparatoire inactif. Il semble, au contraire, avoir pour rôle de dissoudre les substances actives des globules blancs, qui, à l'état de repos, se trouveraient insolubilisées dans le protoplasma cellulaire.

Cependant, si l'acide paraît nécessaire à la dissolution des substances leucocytaires qui ont fait l'objet de nos recherches, il ne s'ensuit pas que sa présence soit également nécessaire lors de l'action même de ces substances sur les éléments microbiens. Pour que cette action se produise, il faut que le milieu soit exactement neutralisé, ou tout au moins que la concentration en acide ou en alcali ne dépasse pas celle d'une solution à 1/300e normale d'acide chlorhydrique ou de soude.

Cette inactivité de l'extrait leucocytaire en milieu acide est due à ce que, comme le montre l'expérience, ses principes actifs, dans ces conditions, ne se fixent pas aux microbes, alors qu'ils sont adsorbés par les mêmes bactéries en milieu neutre.

Ce fait doit être mis en parallèle avec l'action empêchante que la réaction acide exerce sur d'autres phénomènes d'adhésion que peuvent présenter les substances actives des extraits leucocytaires. Ces substances sont adsorbées, en effet, très avidement par le tissu des dialyseurs, tels que ceux de Schleicher et Schühl. Mais cette adsorption ne se produit pas, si le contact de l'extrait et du tissu dialyseur a lieu en milieu acide.

Tout se passe donc comme si le premier acte de l'action des substances actives des leucocytes sur les microbes pouvait être comparé à un phénomène d'adsorption.

Donc, le rôle de l'acide, dans le phénomène qui aboutit à la transformation du vibrion cholérique en granule, parait être de dissoudre les substances actives des leucocytes. Ensuite, pour que celles-ci puissent se fixer sur les bactéries, condition

préalable à leur action sur ces dernières, il faut qu'elles soient ramenées, par la neutralisation du milieu, à un état colloïdal plus instable et, conséquemment, plus favorable à l'adhérence.

Peut-être n'est-il pas illogique d'émettre l'hypothèse que, dans l'intérieur du leucocyte, les faits se succèdent dans le même ordre. Lors de la digestion intracellulaire de germes ingérés par un leucocyte, la vacuole digestive présente d'abord une réaction acide, qui disparaît ultérieurement. Peut-être cette réation acide a-t-elle pour effet de provoquer la dissolution des substances actives des leucocytes, la neutralisation ultérieure de cette réaction ayant pour conséquence de permettre l'action de ces substances sur les bactéries phagocytées, en les ramenant à un état colloïdal favorable à leur fixation sur les corps microbiens.

*
* *

Propriétés des extraits leucocytaires obtenus par les acides.

1° Ces extraits transforment en granules le vibrion cholérique, le vibrio metchnikovii, le bacille pyocyanique, le bacille typhique, le paratyphus A et, dans une mesure moins marquée, le bactérium coli.

Cette diversité de germes sensibles aux extraits leucocytaires permet de présumer que l'action de ceux-ci n'est pas due à des substances diverses, chacune d'elles s'adressant spécifiquement à une espèce microbienne déterminée. En effet, si l'on ajoute à une quantité déterminée d'extrait (2 c. c. 4), un excès de bactéries typhiques ou de bactéries charbonneuses (par exemple, 1 c. c. 5 d'une culture de 24 heures sur gélose, délayée dans 5. c. c. d'eau physiologique), on épuise l'extrait de toute activité, aussi bien vis-à-vis du vibrion cholérique, du vibrion metchnikovii, etc., que du bacille typhique. Il s'agit donc vraisemblablement de substances pouvant porter indifféremment leur action sur des espèces microbiennes diverses.

2° Cette action est entravée par le sérum sanguin inactivé ou par le liquide d'ascite; c'est, par exemple, le cas si on ajoute à 0 c.c. 3 d'extrait 0 c. c. 5 de sérum inactivé de lapin.

3° La marge de la température à laquelle la transformation des vibrions en granules peut se faire est extrêmement large.

Elle ne se produit pas à basse température, mais on l'obtient aisément à 25°, mieux encore à 37°; elle est encore très nette à 60°, même quand l'extrait est additionné d'une quantité de sérum inactivé, insuffisante pour empêcher son action.

4° Les substances actives des extraits leucocytaires se conservent remarquablement soit en milieu neutre, soit en milieu acide.

5° D'autre part, elles résistent également très bien à l'action de la chaleur.

En effet, en milieu neutre, elles ne sont qu'affaiblies par un chauffage de 30 minutes à 80°, et elles ne sont inactivées que par un chauffage à 100° pendant 15 minutes.

En milieu acide $\left(\frac{N}{200} \text{ à } \frac{N}{500}\right)$, elles ne sont pas inactivées, même par un chauffage de 15 minutes à 100° ; car, si on neutralise l'extrait après refroidissement, le vibrion cholérique s'y transforme encore parfaitement en granule. En milieu légèrement alcalin, les substances leucocytaires sont inactivées par un chauffage à 80° pendant 30 minutes.

6° Il ne faudrait pas conclure de la résistance des extraits leucocytaires à la chaleur, surtout en milieu acide, que leurs substances actives ne sont pas de nature protéique. En effet, quand l'extrait chauffé reste actif, on peut y déceler aisément des matières albuminoïdes précipitables.

Rien ne nous autorise donc à l'heure présente, à prétendre que les matières actives des leucocytes ne sont pas des substances protéiques. Aucune méthode ne nous a permis jusqu'ici de les en séparer. C'est ainsi que si on traite un extrait après dessiccation, par l'alcool, l'acétone, l'éther ou un mélange de ces corps, le liquide n'en retire aucun principe actif, et la dissolution ultérieure des éléments de l'extrait qui sont restés insolubles au contact de ces solvants se montre parfaitement capable d'agir sur les vibrions. D'autre part, les substances leucocytaires actives ne dialysent pas en présence d'eau physiologique (1).

(1) On prend, bien entendu, pour faire cette recherche, la précaution d'acidifier l'extrait, de même que l'eau physiologique extérieure au dialyseur (concentration $\frac{N}{100}$ HCl), attendu que (voir plus haut), en milieu neutre, les substances leucocytaires se fixent sur la membrane dialysante.

7° Les extraits, tout en étant énergiquement bactériolytiques, se montrent complètement privés de toute action hémolytique, même vis-à-vis de globules sensibilisés. Ce fait mérite d'autant plus d'être signalé que, d'après Bordet (1), divers expérimentateurs ont noté un certain pouvoir hémolytique dans leurs extraits. Cette propriété surprend d'autant plus que, ainsi qu'on le sait depuis longtemps, les hématies englobées par un leucocyte n'y subissent pas rapidement de transformations comparables à celles qui constituent le phénomène de l'hémolyse.

Nous nous sommes assuré que l'absence de pouvoir hémolytique dans nos extraits n'est pas due à l'absence de l'un ou l'autre des deux fragments (chaînon intermédiaire, chaînon terminal), que l'on distingue dans l'alexine. En effet, ni l'addition de chaînon intermédiaire, ni l'addition de chaînon terminal ne confère de pouvoir hémolytique à l'extrait. On doit donc admettre, que, ne pouvant être complété ni par l'un ni par l'autre, il ne contient ni l'un ni l'autre.

D'ailleurs, il ne donne pas lieu davantage au phénomène de la conglutination de Bordet et Streng (2), qui s'observe, comme on le sait, quand on ajoute du sérum inactivé de bœuf à des éléments microbiens ou hématiques, sensibilisés et chargés d'alexine.

8° Il convient toutefois de remarquer que, si les substances actives des extraits leucocytaires ne sont pas hémolytiques, elles sont cependant mieux absorbées par les globules rouges sensibilisés, que par des globules rouges normaux de même espèce.

De même, elles sont absorbées par les précipités spécifiques. C'est ce que montre l'expérience suivante :

On introduit dans 3 tubes (I, II, III) respectivement 1 c. c. 5 de globules lavés de chèvre, non sensibilisés, 1 c. c. 5 de globules sensibilisés et, après lavage, le précipité spécifique obtenu par mélange de 0 c. c. 25 de sérum de bœuf inactivé et dilué au 1/10e et de 0 c. c. 75 de sérum lapin, antibœuf. Après centrifugation, on ajoute à chaque sédiment 2 c. c. d'extrait leucocytaire. Après une action de dix heures, à la température ordinaire, on centrifuge et on met les liquides décantés en contact avec des sédiments respectivement identiques aux précédents. On centrifuge après un nouveau contact de dix heures.

On prépare en même temps 2 tubes témoins, contenant chacun 2 cent. cubes d'extrait, on ajoute à l'un (IV) un volume d'eau physiologique égal au volume

(1) Bordet. *Loc. cit.*
(2) Bordet et Streng. *Centralbl. f. Bakter.*, **49**, 1909.

du sédiment I et II, à l'autre (V), une quantité d'eau physiologique égale au volume du sédiment du tube III.

A 0 c. c. 6 de chacun des liquides I à V, on ajoute 0 c. c. 1 d'une émulsion de choléra ; après une heure, la transformation du vibrion est complète dans les tubes IV et V, nulle dans les tubes II et III, fort prononcée, mais incomplète, dans le tube I.

9° Nous avons constaté que les substances leucocytaires extraites par l'acide n'augmentent pas en quantité ou en activité au cours de la vaccination. Nous avons étudié à cet égard, parallèlement aux exsudats de lapins neufs, les exsudats fournis par des lapins solidement vaccinés contre le vibrion cholérique ou le bacille pyocyanique, ainsi que les exsudats provoqués au cours même de la vaccination, à divers intervalles des injections vaccinantes. Nous n'avons pas davantage constaté de modification appréciable dans des exsudats obtenus, soit chez des animaux neufs, soit chez des animaux vaccinés, non plus par simple injection intrapleurale de bouillon Martin, mais par injection de bouillon additionné d'une quantité importante de bactéries.

Ces expériences confirment les constatations faites antérieurement au sujet du pouvoir bactéricide des extraits leucocytaires par Schneider, Selter (1) ; les substances bactériolytiques des leucocytes se comportent à cet égard comme d'autres principes de l'organisme, tels que l'alexine.

10° Ajoutons enfin que nos extraits leucocytaires ne transforment pas un plus grand nombre de bactéries, lorsque celles-ci ont été sensibilisées au préalable par le sérum spécifique homologue, qu'il s'agisse de vibrions cholériques, ou de bacilles typhiques etc., ainsi que le montre l'expérience suivante :

Expérience. — On délaie dans 25 cent. cubes d'eau physiologique une culture de choléra sur gélose (émulsion I non sensibilisée). On traite 2 c. c. 5 de cette émulsion par 7 c. c. 5 de sérum anticholérique inactivé. Après deux heures, on débarrasse les microbes du sérum et on les remet en suspension dans 2 c. c. 5 d'eau physiologique (émulsion II sensibilisée).

On s'assure que l'émulsion II est réellement sensibilisée, en en mélangeant 0 c. c. 2 à 0 c. c. 05 de sérum frais de lapin, le tout étant additionné de 0 c. c. 6 d'eau physiologique. Après un séjour de quarante-cinq minutes à 37°, la transformation des vibrions est complète, tandis qu'elle est nulle dans un tube semblable, contenant, au lieu de vibrions de l'émulsion II, 0 c. c. 2 de l'émulsion I.

(1) D'après Selter. *Loc. cit.*

On introduit ensuite, dans les tubes 1 à 5, 0 c. c. 1 de l'émulsion I, dans les tubes 6 à 10, 0 c. c, 1 de l'émulsion II ; on ajoute à chacun des 5 premiers des doses décroissantes d'extrait (0 c. c. 5 à 0 c. c. 1), les mêmes quantités étant introduites dans les tubes correspondants de la série 6 à 10. Le volume total est porté partout à 0 c. c. 6 par addition d'eau physiologique. Après un séjour d'une heure à 37°, la transformation des vibrions en granules est exactement la même, dans les tubes correspondants des deux séries ; elle est complète dans les deux tubes contenant 0 c. c. 5 d'extrait, partielle en présence de 0 c. c. 3 et nulle dans les tubes ne renfermant que 0 c. c. 1 d'extrait.

Il était d'autant plus indiqué de faire cette recherche, que certains auteurs ont prétendu avoir réactivé des immunsérums chauffés à 55° par addition d'extraits leucocytaires, alors que d'autres n'ont eu à cet égard que des résultats négatifs (1).

*
* *

Parmi les propriétés des substances leucocytaires obtenues en milieu acide, il en est un certain nombre que divers auteurs ont observées dans les extraits bactéricides dus à d'autres méthodes. Ils ont constaté, notamment, la résistance relative des substances bactéricides de leurs extraits à la chaleur, au vieillissement ; ils ont observé leur insolubilité dans l'alcool, l'acétone, l'éther, etc., et ont noté l'action empêchante du sérum.

C'est en se basant sur ces différences entre les propriétés de leurs extraits et celles de l'alexine, qu'ils ont conclu à l'absence de relation entre celles-ci et les substances bactériolytiques leucocytaires.

Nous avons dit plus haut que cette conclusion prêtait le flanc à la critique ; les extraits leucocytaires obtenus jusqu'ici n'ont jamais reproduit, en effet, la transformation caractéristique subie par certains microbes, comme le vibrion cholérique, dans l'intérieur du phagocyte. Les expériences auxquelles ils ont servi ne peuvent donc être opposées à l'argument tiré de l'analogie de cette transformation et de la modification subie par les microbes sous l'influence de l'alexine, en faveur de l'identité de celle-ci et des substances bactériolytiques leucocytaires.

(1) D'après Levaditi. *Loc. cit.*

La méthode d'extraction par les acides nous fournit, au contraire, des liquides capables de transformer en granules les espèces bactériennes susceptibles de subir cette transformation à l'intérieur des leucocytes. Elle donne donc les éléments nécessaires pour discuter la valeur de cet argument. Or, les propriétés des substances leucocytaires obtenues par ce procédé sont bien différentes des caractères de l'alexine. L'argument invoqué en faveur de l'identité de celle-ci et de ces substances, que nous venons de rappeler, n'est donc pas fondé.

a) En effet, tout en étant aptes à transformer en granule le vibrion cholérique et d'autres bactéries, les extraits leucocytaires sont dépourvus de tout pouvoir hémolytique et n'en acquièrent aucun, qu'on les additionne de chaînon intermédiaire ou de chaînon terminal, vis-à-vis de globules rouges sensibilisés, susceptibles d'être dissous par l'alexine de même espèce animale.

Donc si, en ce qui concerne l'alexine, la bactériolyse est bien un phénomène analogue à l'hémolyse, il ne faut pas en conclure que toute substance susceptible de déterminer la première doive nécessairement être capable de produire la seconde.

b) Nos extraits leucocytaires ne sont pas davantage rendus hémolytiques par l'addition d'auxilysine (1) de cobaye. Ils se distinguent encore de l'alexine en ce qu'ils ne préparent pas les éléments sensibilisés à l'action ultérieure d'autres agents, par exemple la conglutinine du sérum inactivé de bœuf.

c) Leur action s'exerce encore à des températures incompatibles avec celle de l'alexine.

d) Les substances actives de ces extraits résistent à la chaleur beaucoup mieux que l'alexine. Ce fait, observé depuis longtemps par beaucoup d'auteurs pour divers extraits leucocytaires, mérite cependant encore d'être rappelé. Ainsi que le signale Levaditi (2), la résistance à la chaleur des substances actives des liquides de l'organisme est fort influencée par la composition du milieu où elles se trouvent.

Or les extraits leucocytaires que nous avons obtenus résistent à la chaleur, ainsi que nous avons pu nous en assurer,

(1) Gengou. *Centralbl. f. Bakter.*, **19**.
(2) *Loc. cit.*

même s'ils sont additionnés de sérum inactivé, de façon à constituer un liquide comparable à de l'alexine diluée.

e) Enfin, contrairement à ce qui se passe pour l'alexine de même espèce, les microbes impressionnés par le sérum spécifique homologue ne sont pas plus sensibles à l'influence des substances bactériolytiques des leucocytes que les microbes neufs. Ce fait nous paraît confirmer, d'une manière particulièrement démonstrative, la notion que l'alexine n'est pas identique aux substances leucocytaires, que détruisent les bactéries à l'intérieur des leucocytes.

On peut cependant nous objecter que les précipités spécifiques, comme nous l'avons signalé nous-même ci-dessus, absorbent remarquablement les substances actives des extraits leucocytaires et que, de même, les globules sensibilisés se distinguent à cet égard des globules neufs. Or la propriété d'être absorbée par les éléments sensibilisés et de ne pas l'être (ou peu) par les éléments non sensibilisés, est une propriété essentielle de l'alexine.

Il convient de remarquer, à ce sujet, que divers auteurs ont montré que le pouvoir des éléments sensibilisés de fixer à leur surface de nouveaux éléments ne s'exerce pas seulement vis-à-vis de l'alexine. Bordet et Gengou (1) ont constaté, en effet, que si on mélange en certaines proportions un antigène amorphe (sérum) et l'antisérum correspondant, puis qu'on ajoute à l'ensemble des globules rouges, ceux-ci adhèrent au précipité spécifique résultant de l'union de l'antigène et de l'anticorps et forment rapidement de gros amas.

De même, les globules rouges sensibilisés adhèrent remarquablement aux globules blancs, tandis que les hématies non sensibilisées s'y refusent (Barikine) (2). Divers faits montrent donc que le pouvoir d'adsorption des éléments sensibilisés peut s'exercer vis-à-vis d'autres éléments que l'alexine. Conséquemment, si la fixation de l'alexine sur des éléments morphologiques, tels que microbes ou globules, sous l'influence d'un sérum, constitue la preuve — ce qui reste vrai — de la présence, dans ce sérum, d'anticorps spécifiques, homologues de ces

(1) BORDET et GENGOU. *Centralbl. f. Bakter.*, **19**.
(2) BARIKINE. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1910, **8**.

éléments, on ne peut pas par contre conclure que toute substance se fixant mieux sur des éléments sensibilisés que sur les mêmes éléments non sensibilisés soit de l'alexine.

L'objection que l'on pourrait tirer de nos propres expériences ne paraît donc pas établie.

Tout se passe donc comme si les substances, qui, dans les leucocytes, impriment aux vibrions cholériques la même transformation que celle qu'ils subissent sous l'influence de l'alexine, étaient bien distinctes de celle-ci. Cette transformation granulaire pouvant être produite par des substances différentes, on ne peut donc conclure, sans investigation plus complète, de la production de ce phénomène sous l'influence de liquides différents, que l'action de ceux-ci est due à une seule et même substance.

Les résultats consignés ci-dessus permettent, d'autre part, de réfuter l'opinion d'après laquelle les microbes ne se transformeraient en granules à l'intérieur des leucocytes, que parce qu'ils se sont auparavant teintés d'alexine.

Cette allégation, d'après Selter (1), aurait encore été formulée récemment par Pfeiffer.

En effet, dans nos expériences, les bactéries ne sont, à aucun moment, en contact avec du sérum ou tout autre liquide contenant de l'alexine. Lorsqu'ils se transforment en granules, en présence des extraits leucocytaires, c'est bien à l'action des substances fournies par les globules blancs que ce phénomène est dû, et non à leur imprégnation préalable par l'alexine.

*
* *

Nous avons enfin recherché si les substances des extraits leucocytaires, qui déterminent la transformation granulaire des bactéries utilisées dans nos recherches, se confondent avec les ferments protéolytiques que plusieurs auteurs ont signalés chez les globules blancs.

Nos extraits n'ont pas montré de propriété protéolytique très marquée. Toutefois, dans des conditions que nous avons précisées, ils sont régulièrement capables de dissoudre la gélatine.

(3) *Loc. cit.*, p. 119.

Pour le démontrer, nous avons mélangé à un volume constant (0 c. c. 5) de gélatine à 10 p. 100, de réaction neutre, des volumes croissants (0 c. c. 1 à 0 c. c. 5) d'extrait leucocytaire, le volume total étant toujours ramené à 1 cent. cube par addition d'eau physiologique. Après un séjour de vingt-quatre heures à 37°, le mélange est parfaitement coagulable dans le tube témoin (pas d'extrait ; 0 c. c. 5 d'eau physiologique), tandis qu'il est devenu incoagulable dans les tubes contenant 0 c. c. 3 à 0 c. c. 5 d'extrait.

Les propriétés de ce ferment gélatinolytique se confondent, à certains égards, avec celles des substances des extraits leucocytaires qui transforment les vibrions en granules. Ainsi il réclame, comme elles, une réaction neutre ; il est absorbé par les bactéries, par les précipités spécifiques et par les tissus des dialyseurs ; il n'exerce pas son action en présence de sérum.

Par contre, certains de ses caractères se distinguent des propriétés des substances bactériolytiques des leucocytes :

a) Quoique l'intervention de l'acide soit nécessaire à l'extraction du ferment gélatinolytique, elle exige cependant certaines précautions pour donner un résultat positif. Nous avons vu plus haut que, par l'action de l'acide, on obtient un extrait bactériolytique, quelle que soit la durée de l'action de l'acide, du moment que cette action s'exerce pendant une heure au moins.

Au contraire, il importe, pour observer le pouvoir gélatinolytique, de ne laisser agir l'acide sur les leucocytes que pendant une ou deux heures à la glacière. Si on prolonge cette action ou si on laisse à l'extrait sa réaction acide pendant vingt-quatre heures, l'extrait a perdu toute propriété gélatinolytique, tout en gardant intacte son action sur les bactéries.

b) La dissolution de la gélatine par l'extrait ne se manifeste plus, lorsque les mélanges sont placés à 60° ; elle est optimale à 37°, moins marquée à 45° et plus faible encore à 52°. Au contraire, le pouvoir bactériolytique s'exerce encore à 60°.

c) Enfin, le pouvoir gélatinolytique de l'extrait est détruit par un chauffage à 65°, tandis que le pouvoir bactériolytique résiste à 80°.

Tout se passe donc, semble-t-il, comme si les propriétés bactériolytique et gélatinolytique de nos extraits étaient dues à des substances distinctes. Cette conclusion confirme du reste celle

de divers auteurs, tels que Jochmann, qui ont étudié comparativement les pouvoirs protéolytique et bactéricide d'extraits leucocytaires obtenus par d'autres procédés.

CONCLUSIONS

1° En soumettant des leucocytes à l'action des acides, on peut extraire de ces cellules les substances qui, dans leur intérieur, transforment en granules les bactéries ingérées et les tuent.

2° En raison des propriétés de ces substances, on ne peut les considérer comme identiques à l'alexine ou à l'un de ses chaînons.

3° La transformation de certaines espèces microbiennes en granules peut donc être produite par différentes substances de l'organisme.

Conséquemment, on ne peut, sans investigation plus approfondie, la tenir, dans tous les cas, pour la preuve de l'intervention de l'alexine.

4° Tout se passe comme si les substances bactériolytiques des leucocytes étaient distinctes des ferments protéolytiques de ces cellules.

RECHERCHES
SUR LE MÉCANISME DES ACTIONS ANTICOAGULANTES

par le Dr André GRATIA.

Parmi les nombreuses actions anticoagulantes susceptibles de maintenir la fluidité du sang, il en est un certain nombre dont nous ignorons encore complètement le mécanisme. Ayant été amené à poursuivre des recherches dans ce domaine, je me propose d'en rassembler ici les résultats (1). Mais avant d'entrer dans le détail de mes expériences, il importe de situer la question et de rappeler tout d'abord les principales théories qui actuellement tentent d'expliquer le déterminisme normal de la coagulation du sang.

CHAPITRE I

LES THÉORIES MODERNES DE LA COAGULATION DU SANG

Ces théories sont au nombre de trois principales : celle de Bordet et Delange qui est en quelque sorte l'aboutissant le plus parfait de la théorie classique successivement édifiée par Schmidt et ses élèves, par Fuld et Spire, puis par Morawitz; la théorie de Nolf qui s'inspire surtout de la conception originale et révolutionnaire de Wooldridge; et enfin la théorie de Howell qui, sous son apparence plus simple, s'adapte en réalité difficilement aux faits et doit en conséquence entraîner pour se soutenir des complications à l'infini.

Ces théories reconnaissent, toutes, l'intervention, dans la coagulation du sang, de trois substances fondamentales, à savoir : une substance humorale thermolabile, une substance cellulaire thermostabile et le fibrinogène. Bien qu'il s'agisse

(1) Les principaux résultats de ces recherches ont déjà été résumés dans différentes notes parues dans les *C. R. de la Soc. de Biol.*, **83**, 1920.

vraisemblablement toujours des trois mêmes substances, quelle que soit la théorie, leurs noms et leurs attributions varient beaucoup selon les auteurs.

1° Théorie de Bordet et Delange (1).

D'après Bordet et Delange, la substance cellulaire ou *cytozyme* est un lipoïde existant dans toutes les cellules, mais plus spécialement à l'intérieur des plaquettes. Quant à la substance humorale ou *sérozyme*, elle existe dans le plasma circulant à l'état inactif de *prosérozyme*. Ce n'est qu'au moment de la coagulation qu'elle apparaît sous la forme active de sérozyme dont on retrouve l'excédent dans le sérum après la coagulation.

Pour que le sang coagule il faut d'abord que, grâce à l'action de contact exercée par les corps étrangers (2 et 3), le cytozyme sorte des plaquettes et le prosérozyme se transforme en sérozyme actif. Après cet acte préliminaire, le sérozyme et le cytozyme peuvent réagir en présence des sels de calcium pour donner naissance à la *thrombine* qui, dans un troisième stade, enfin, coagule le *fibrinogène*.

	1			2		3	
Prosérozyme	→	Sérozyme	} Ca	→	Thrombine	} →	Fibrine.
Plaquettes	→	Cytozyme (lipoïdes)					
					Fibrinogène		

2° Théorie de Howell (4).

D'après Howell, la substance humorale ou *prothrombine* (sérozyme) peut être directement transformée en thrombine par les sels de calcium. Mais cette transformation est entravée, dans le plasma circulant, par une substance antagoniste, l'*antithrombine*. La substance cellulaire ou *thromboplastine* qui, comme dans la théorie précédente, est un lipoïde existant dans les

(1) Bordet et Delange. Ces *Annales*, septembre 1912, **26**, p. 657; Mai 1913, **27**, p. 342.
(2) A. Gratia. *Journ. de Physiol. et de Pathol. génér.*, 1917.
(3) A. Gratia. *C. R. Soc. Biol.*, novembre 1919.
(4) Howel. *Amer. Journ. Physiol.*, 1910, **26**, p. 453; 1912, **29**, p. 187 ; **31**, p. 1, **32**, p. 264; **33**, p. XIII; **34**, p. 143, 476, 483; **35**, p. 1.

plaquettes et dans les tissus, n'aurait d'autre but que de neutraliser l'antithrombine au sortir des vaisseaux et permettre ainsi la production de la thrombine sans entrer dans sa constitution.

{ Prothrombine + Calcium = Thrombine }
{ Antithrombine } → Fibrine.
+ ↘ Fibrinogène }
Thromboplastine

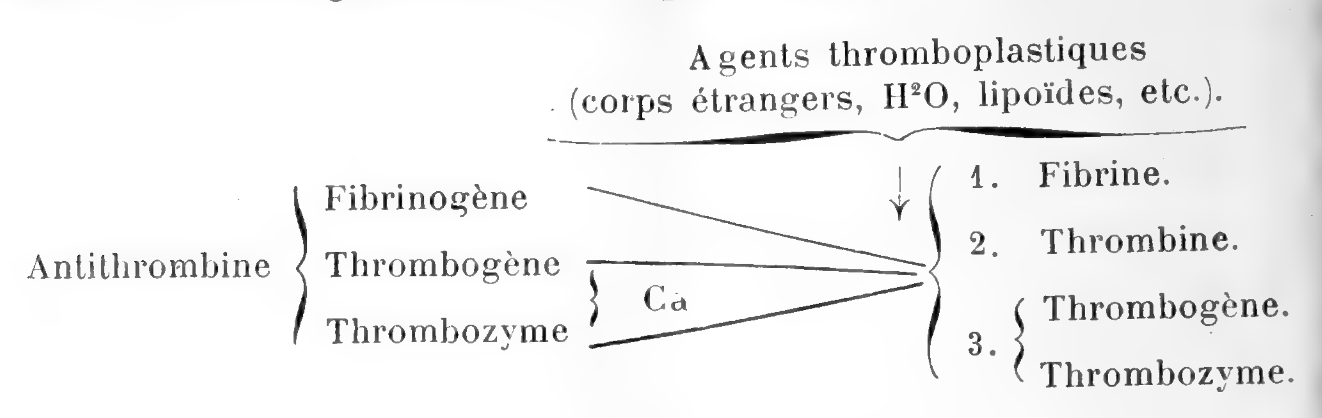
Ainsi que Bordet l'a montré déjà dans son dernier mémoire (1), cette théorie est incompatible avec un certain nombre de faits et se heurte *a priori* à toute une série d'objections de principe. Nous verrons d'ailleurs que lorsque nous la soumettrons plus loin à la vérification expérimentale, elle ne résiste pas à la critique.

3° Théorie de Nolf (2).

Pour Nolf, enfin, il existe en abondance dans le plasma trois colloïdes équipotentiels : le *fibrinogène*, le *thrombogène* (sérozyme) et le *thrombozyme* (cytozyme). Ces trois colloïdes sont maintenus dans un état d'équilibre correspondant à la fluidité par des influences antagonistes (antithrombine). Mais si cet équilibre est rompu par des *agents thromboplastiques* (corps étrangers, précipités colloïdaux, plaquettes, sucs de tissus, *lipoïdes*, microbes, eau distillée, chloroforme, etc.), les trois colloïdes se combinent mutuellement en proportions variables pour donner toute une série de complexes plus ou moins saturés de fibrinogène. L'on obtiendra ainsi des complexes de thrombogène et de thrombozyme, riches en fibrinogène, c'est la fibrine; des complexes de thrombogène et de thrombozyme, privées de fibrinogène, c'est la thrombine; et enfin, il restera encore du thrombogène et du thrombozyme non combinés. La thrombine, conformément à l'opinion déjà ancienne de Wooldridge, serait donc un produit de la coagulation au même titre que la fibrine ; c'est parce qu'elle n'est pas saturée de fibrinogène et, par conséquent, instable, qu'elle se saturera, se stabi-

(1) Bordet. Ces *Annales*.
(2) Nolf. *Arch. intern. de Physiol.*, **1**, p. 1 ; **4**, p. 1 ; **6**, p. 1, 115 et 306 ; **7**, p. 280, 379 et 411 ; **9**, p. 205 ; **10**, p. 37.

lisera, bref, donnera de la fibrine dès qu'on la mettra en présence de fibrinogène; mais ce fait serait donc la conséquence même de la coagulation et non pas la cause obligée de celle-ci.



Cette conception séduit surtout par ce qu'elle a de spéculatif, si je puis dire, dans son interprétation. Mais c'est justement son côté faible, celui qui a le moins de soutien expérimental. Il repose tout entier sur le rôle actif que Nolf attribue au fibrinogène. Or, les expériences tout à fait concordantes que Bordet (1) d'une part, et moi-même (2) d'autre part, avons réalisées sur la production de la thrombine, en absence de fibrinogène, montrent que celui-ci ne joue aucun rôle dans cette production. Il est la substance coagulable purement passive. Dès lors, la thrombine est bien la substance active; elle n'est pas un produit de la coagulation, mais bien la cause de ce phénomène.

La théorie de Nolf ainsi épurée de ses considérations spéculatives est en concordance avec la théorie de Bordet et Delange. La thrombine est un complexe de deux substances unies en présence de calcium : le thrombogène et le thrombozyme. Or, le thrombogène affecte avec le sérozyme une étroite ressemblance : tous deux sont thermolabiles; tous deux donnent de la thrombine en s'unissant, en présence de calcium, au produit des cellules; tous deux se consomment par cette réaction. Nolf attribue au thrombogène une origine hépatique; j'ai montré que le sérozyme est sécrété par le foie (3).

Biologiquement, le thrombozyme et le cytozyme, eux aussi, sont identiques ; tous deux sont sécrétés par les leucocytes, par les plaquettes et se trouvent dans les sucs de tissus; tous deux

(1) Bordet. *C. R. Soc. belge Biol.*, octobre 1919.
(2) A. Gratia. *C. R. Soc. Biol.*, novembre 1919.
(3) A. Gratia. *Bull. Soc. roy. Sc. méd. et nat. de Bruxelles*, 1914.

LA NATURE

Ingénieurs

Physiciens

Chimistes

Industriels

Hommes de Science

Médecins

Officiers

Voyageurs

Propriétaires

Commerçants

Châtelains

Jeunes Gens

Vous trouverez dans **LA NA-TURE**, dans des articles de vulga-risation clairs et variés, l'expos
au jour le jour du mouvemen
scientifique contemporain : *Mé-canique, Industrie, Outillage*
Photographie, Electricité, Tra-vaux publics, Art de l'Ingénieur
Transports, Aviation et Aéronautique, Marine, etc...

Vous trouverez dans **LA NA-TURE** des articles se rapportant à l'évolution de toutes les *Sciences : Géographie, Ethnographie, Questions Economiques, etc.*

Vous trouverez dans **LA NA-TURE** ce qu'il faut pour *vous in-truire, vous distraire, vous doc-menter*, quelle que soit votre vi

à la **MAISON**,

à la **CAMPAGNE**,

à l'**ATELI**

LA NATURE vous sera uti

MASSON & Cie



MASSON ET Cie, Éditeurs
120, Boulevard Saint-Germain, 120 — PARIS

Bulletin de Souscription

à détacher et à envoyer par la poste

Ci-inclus, je vous adresse la somme de..............................

....

en mandat-poste, ou chèque sur Paris, ou par compte chèques postaux N° 599, pour un abonnement à **LA NATURE** *à partir du*..............................

(Les abonnements partent du premier de chaque mois.)

NOM..............................

ADRESSE..............................

....

PRIX DE L'ABONNEMENT :

SIGNATURE :

France....	Un An :	50 fr. —	Six mois :	25 fr.
Étranger..	— :	60 fr. —	— :	30 fr.

ENVOI DE SPECIMEN SUR DEMANDE



Pr. 925. 4941-21. — TOURS, E. ARRAULT & Cie

donnent de la thrombine en s'unissant, en présence de calcium, à la substance humorale (thrombogène ou sérozyme) et se consomment au cours de cette réaction.

Chimiquement, le thrombozyme n'est pas défini, mais le cytozyme a été reconnu de nature lipoïdique. Il semblerait, par conséquent, tout naturel de continuer le rapprochement et d'admettre que le thrombozyme est lipoïdique. Mais Nolf s'y oppose. Préférant laisser dans l'ombre la nature chimique du thrombozyme, il refuse aux lipoïdes toute participation dans la constitution de la thrombine et les assimile, au contraire, aux agents thromboplastiques. Outre que cette façon de voir complique encore la question, elle ne cadre pas très bien avec les faits. Tandis que les lipoïdes, à l'égal du cytozyme des plaquettes et des sucs de tissus, engendrent de la thrombine lors qu'on les ajoute à du sérum, jamais aucun agent thromboplastique, si énergique soit-il — ni poudre de verre, ni précipité colloïdal, ni eau distillée — ajouté au sérum le plus riche en sérozyme, n'aura pareil effet. C'est là le véritable critérium qui rattache donc bien les lipoïdes au cytozyme, et par suite au thrombozyme, et les écarte, au contraire, des agents thromboplastiques.

En fin de compte, nous adopterons la théorie et les méthodes de Bordet et Delange. Nous verrons d'ailleurs que nos recherches leur apportent à diverses reprises de nouvelles confirmations.

CHAPITRE II

LES ACTIONS ANTICOAGULANTES

Le sang qui normalement se coagule au sortir des vaisseaux, peut rester fluide dans une foule de circonstances. Qu'un des multiples facteurs de la coagulation du sang vienne à manquer, ou que la présence d'une substance dite anticoagulante détruise un des principes coagulants ou s'oppose à l'une des phases du phénomène, et le processus se verra arrêté ou tout au moins ralenti. Voici un certain nombre d'exemples de l'espèce.

Si l'on chauffe du plasma à 58°, on en détruit le fibrinogène

ainsi que le sérozyme ; on le rend, par conséquent, désormais incoagulable.

Nous savons que le foie sécrète le fibrinogène et le sérozyme. Nous comprenons, dès lors, que toute insuffisance fonctionnelle de cet organe compromette le processus de la coagulation du sang ; les intoxications aiguës par le chloroforme, le phosphore ou l'arsenic tout comme aussi l'ablation expérimentale du foie chez les animaux, s'accompagnent d'incoagulabilité sanguine. Dans bien des affections hépatiques, d'ailleurs, l'on observe des troubles de la coagulabilité.

Bordet et Delange ont observé que le précipité colloïdal de phosphate tricalcique a la propriété d'adsorber le sérozyme ; aussi, du plasma phosphaté, c'est-à-dire du plasma qui a subi l'action adsorbante du phosphate tricalcique, reste fluide faute de sérozyme.

Moins un plasma contient de cellules et moins il est apte à se coaguler ; dans certains cas même, il peut rester complètement fluide ; il en est ainsi, par exemple, pour le plasma d'oiseau, encore appelé plasma de Delezenne, du nom de ce savant qui le premier réalisa l'expérience, et pour le plasma filtré sur bougie Berkefeld. Privés de cellules, ces plasmas ne contiennent plus ou presque plus de cytozyme et restent fluides aussi longtemps qu'on ne leur en restitue pas, sous la forme soit de plaquettes, soit de sucs de tissus, soit de lipoïdes.

De même, Zak (1) rendait incaogulable du plasma de cheval en le délipoïdant par extraction à l'éther de pétrole. Ce plasma délipoïdé et, par conséquent, privé de cytozyme, se coagule si on lui rend des lipoïdes.

On sait que parmi les venins, il en est qui sont hémolytiques en même temps qu'anticoagulants. Or, précisément, les recherches de Delezenne (2) ont montré que l'action hémolytique de ces venins est indirecte : c'est en dissociant la lécithine qu'ils donnent naissance à un produit très hémolytique : la *lysocithine*. Si donc ces venins sont capables de dissocier les

(1) Emil Zak. *Arch. f, exp. Pathol. und Pharmak.*, **70**, 18 octobre 1912.

(2) Delezenne et Fourneau. *Bull. Soc. chim.*, 4e série, **15** et **16**, p. 354 et 421. — Delezenne et Ledert. *C. R. Acad. Sc.*, **153**, p. 81 ; *C. R. Soc. Biol.*, **71**, p. 121.

lipoïdes, ils détruisent du même fait le cytozyme, d'où leur action anticoagulante, ainsi que Houssay et Sordelli (1) l'ont encore confirmé récemment.

Il serait assez curieux de rapprocher de l'action de ces venins le pouvoir anticoagulant que j'ai dernièrement reconnu au streptocoque hémolytique, lorsqu'on le laisse se développer dans du sang ou du plasma oxalaté (2). Le streptocoque doit-il, comme les venins, ses actions à la fois hémolytiques et anticoagulantes à un pouvoir lipolytique ? C'est ce qu'il est fort logique de supposer en attendant que l'expérience nous donne sur ce point une réponse probante.

Le sang reste donc fluide s'il est privé d'une des trois substances indispensables à toute coagulation normale, à savoir : le fibrinogène, le sérozyme et le cytozyme. Mais, même lorsqu'il les possède toutes trois en quantités suffisantes, il ne se coagulera pas, s'il ne réalise pas en même temps les conditions favorables à leur réaction.

Ainsi, comme nous l'avons dit plus haut, en exposant la théorie de Bordet et Delange, pour se coaguler le sang doit tout d'abord percevoir le contact d'un corps étranger. Les tissus, en dehors de leur apport de cytozyme, exercent cette action de contact avec la plus grande intensité, le verre également; par contre, la vaseline, et surtout la paraffine, l'exercent très peu et l'endothélium vasculaire pas du tout. C'est pourquoi le sang se coagule si vite dans un récipient en verre, si lentement dans un tube paraffiné, et pas du tout dans un segment de veine isolé entre deux ligatures.

Le froid, la forte concentration saline, le glucose sont anticoagulants parce qu'ils s'opposent à la réaction sérozyme-cytozyme. De même, si les agents décalcifiants (oxalates, citrates et fluorures alcalins) sont anticoagulants, c'est précisément parce que, sans calcium, la réaction sérozyme-cytozyme ne peut se faire.

Il est aussi des agents anticoagulants dont le mode d'action n'a pas encore été étudié, tels sont notamment les sels de

(1) Houssay et Sordelli. *Journ. de Physiol. et de Pathol. génér.*, n° 4, 18, p. 781.

(2) A. Gratia. Actions diverses des microbes sur la coagulation du sang. *C. R. Soc. belge Biol.*, novembre 1919.

terres rares, dont les curieuses propriétés anticoagulantes ont été observées par Frouin.

Et nous arrivons enfin aux substances anticoagulantes proprement dites, celles qui, sans qu'on puisse tout à fait dire d'elles qu'elles sont physiologiques, sont néanmoins élaborées par des êtres vivants, soit au cours de l'activité normale, soit en réponse à des excitations pathologiques ou expérimentales. Ces substances, qu'on désigne sous le terme général d'*antithrombine*, ont la propriété, comme leur nom l'indique, de neutraliser la thrombine. En réalité, il faut distinguer différentes antithrombines. Certaines se rencontrent à l'état normal dans la tête des sangsues (hirudine), dans la tête de quelques parasites, les sclérostomes par exemple, dans l'hépatopancréas de l'écrevisse; il y en aurait aussi dans le venin de divers serpents. Mais il existe aussi une antithrombine que le foie des animaux, et plus particulièrement celui du chien, sécrète en abondance, lorsqu'on injecte rapidement dans la circulation certains produits, tels que la peptone, par exemple, qui ne sont pas anticoagulants par eux-mêmes. Par le fait de cette sécrétion anormale d'antithrombine, le sang devient incoagulable et donne après centrifugation un plasma stable et anticoagulant, qui est le *plasma de peptone*. Une semblable sécrétion se produit aussi au cours du choc anaphylactique. L'injection déchaînante d'un antigène vis-à-vis duquel l'animal est sensibilisé a pour résultat, tout comme l'injection de peptone, de rendre le sang incoagulable et anticoagulant.

Il est bien d'autres manifestations anticoagulantes sur lesquelles nous ne pouvons nous étendre de peur de nous égarer. Tels sont les effets des injections intraveineuses de sucs de tissus, d'extraits microbiens ou de certains venins. Telle aussi la production d'un sérum contenant une antithrombine anti-lapin que Bordet et Gengou ont réalisée en préparant des cobayes à l'aide de sang de lapin.

Nous devons forcément limiter le cadre de nos recherches, c'est pourquoi nous nous arrêterons pour le moment à l'étude exclusive de l'hirudine et de l'antithrombine du plasma de peptone.

CHAPITRE III

LE PLASMA DE PEPTONE

La sécrétion par le foie d'une antithrombine capable de maintenir la fluidité du sang à la suite d'une injection intraveineuse brusque de peptone chez le chien, est un fait trop classique pour que nous nous y arrêtions ici.

Le mécanisme de cette réaction nous est cependant encore inconnu. *In vitro*, la peptone n'a aucune propriété anticoagulante; au contraire, convenablement neutralisée, elle manifeste des actions nettement coagulantes grâce au cytozyme qu'elle a hérité des tissus dont elle provient et qui, en tant que lipoïde, a résisté à la digestion pepsinique (Bordet et Delange). On pourrait se demander si la sécrétion d'antithrombine par le foie à la suite de l'injection de peptone n'est pas une simple réaction de défense de l'organisme contre le cytozyme coagulant que la peptone introduit avec elle dans la circulation. Cette hypothèse paraissait d'autant plus plausible que les injections de sucs de tissus, riches aussi en cytozyme, déterminent l'incoagulabilité du sang. En vérité, en injectant du cytozyme lipoïdique, extrait tant de la peptone que de divers tissus de chien ou de lapin, je n'ai jamais obtenu la moindre réaction anticoagulante chez le chien; au contraire, le cytozyme se comporte *in vivo* comme *in vitro* : il rend le sang plus coagulable (1). Ces résultats sont d'accord avec ceux que Bordet et Delange ont obtenus chez le lapin (2).

En somme, on ne sait pas encore actuellement à quoi la peptone doit ses effets, mais aussi bien, c'est là un point de vue sur lequel nous ne pouvons insister ici, car ce qui nous intéresse c'est surtout les propriétés du plasma de peptone et le mécanisme par lequel l'antithrombine qui s'y trouve, en maintient la fluidité.

Nous possédons différents moyens de provoquer une coagulation complète et rapide du plasma de peptone. Ils peuvent être de trois ordres :

(1) A. Gratia. *Bull. Soc. roy. Sc. méd. et nat. Bruxelles*, mai 1913.
(2) Bordet. *Ibidem*, août 1913.

1° On peut compenser l'antithrombine en ajoutant une assez grande quantité de thrombine toute faite.

2° On peut aussi, au lieu d'ajouter de la thrombine, susciter, au sein du plasma de peptone même, une production abondante et rapide de thrombine autonome, en ajoutant un supplément de cytozyme sous forme de plaquettes, de sucs de tissus ou de lipoïdes.

3° On peut enfin, sans ajouter aucun supplément de thrombine ou de ses générateurs, créer des conditions de milieu qui, dans la lutte entre les substances coagulantes du plasma et l'antithrombine, font pencher la balance en faveur des premières. Ces conditions de milieu favorables peuvent être réalisées par l'addition au plasma de certains agents que Nolf appelle *agents thromboplastiques*. Ce sont notamment : l'eau distillée, les sels neutres, les acides, un courant de CO^2, que Fano avait découverts. Nolf y ajoute : les corps pulvérulents, certains précipités colloïdaux (oxalate ou fluorure de calcium, à l'état colloïdal), les sucs de tissus et même les lipoïdes.

Que l'addition de thrombine ou de cytozyme fasse coaguler le plasma de peptone, cela se conçoit aisément, aussi je ne m'y arrête pas davantage pour le moment. En ce qui concerne les agents thromboplastiques, il y a lieu de remarquer que ce terme masque notre ignorance et fait un peu songer aux « vertus dormitives de l'opium ». Bien entendu, on sait que ces corps n'apportent aucune substance capable d'entrer dans la constitution de la thrombine ou de la fibrine ; ce ne sont pas des agents déterminants de la coagulation, mais seulement des favorisants. En réalité, quel assemblage de facteurs disparates ils représentent ! Quelle relation peut-on, par exemple, établir entre l'eau distillée, les acides, les corps pulvérulents ? Il nous serait même bien difficile de dire s'ils favorisent la coagulation ou bien en secondant directement l'action des substances coagulantes, ou bien, au contraire, indirectement en paralysant les substances anticoagulantes telles que l'antithrombine. Il est probable que les deux éventualités peuvent se présenter et si nous pouvions nous baser sur des impressions, nous tendrions volontiers à dire que l'eau distillée aide les réactions coagulantes, tandis que le CO^2 paralyse l'antithrombine. L'eau distillée, en effet, favorise beaucoup la coagulation du plasma

oxalaté recalcifié de mammifères, et aussi du plasma d'oiseau, alors que le CO^2 n'est actif que sur le plasma de peptone.

Cette différence entre l'eau distillée et le CO^2 est plutôt déconcertante. La première idée, en effet, qui vient à l'esprit c'est que l'eau distillée, le CO^2, les acides, ont un mode d'action commun qu'ils doivent à leur influence précipitante sur les globulines. Malheureusement, comme on le voit, les faits ne paraissent pas justifier suffisamment cette hypothèse.

Quant aux corps pulvérulents, aux précipités colloïdaux, ils représentent un énorme déploiement de surface, qui exerce par conséquent des actions de contact particulièrement efficaces, mais sur le mécanisme desquelles nous sommes encore insuffisamment renseignés.

*
* *

Et maintenant comment interpréter la coagulation du plasma de peptone par les lipoïdes? Ce fait, que déjà Wooldridge avait observé, mérite que nous nous y arrêtions plus longuement, car il s'y attache un gros intérêt doctrinal. C'est, en effet, autour de cette question du rôle des lipoïdes dans la coagulation du sang que surgissent les principales divergences d'opinion entre les trois théories modernes, qu'elle peut en quelque sorte servir à caractériser.

Selon Howell, comme nous l'avons déjà dit, les lipoïdes neutraliseraient chimiquement l'antithrombine. Nous verrons plus loin que cette conception ne se vérifie pas.

Pour Bordet et Delange, les lipoïdes représentent la substance active des plaquettes et des sucs de tissus, c'est-à-dire le cytozyme qui, par sa réaction avec le sérozyme du plasma, donne de la thrombine. C'est donc en tant que générateurs de thrombine que les lipoïdes sont susceptibles de faire coaguler le plasma de peptone.

A cette façon de voir, Nolf objecte que le plasma de peptone contient en quantité tous les éléments nécessaires à sa coagulation et que, par conséquent, il n'a besoin d'aucun supplément de substance active. Les lipoïdes ne lui apportent donc rien d'essentiel qui soit susceptible d'entrer dans la constitution même de la thrombine. Ce sont des agents thromboplastiques

qui font coaguler le plasma de peptone, de la même façon que l'eau distillée, le CO^2 ou les précipités colloïdaux, c'est-à-dire en rompant l'équilibre dans lequel l'antithrombine maintient les trois colloïdes générateurs de fibrine.

C'est un point de vue auquel nous ne pouvons nous rallier. Assurément, si nous faisons traverser le plasma de peptone par un courant de CO^2, il se coagule parfaitement et donne un sérum dépourvu d'antithrombine et riche, au contraire, en thrombine. Un tel plasma contenait donc bien tous les éléments nécessaires à sa coagulation et notamment le cytozyme. Mais si ce cytozyme est suffisant lorsque le CO^2 a paralysé l'antithrombine et transformé, en somme, le plasma de peptone en un plasma normal, il n'en est pas du tout de même quand on abandonne le plasma de peptone à lui-même, c'est-à-dire à l'influence prépondérante de son antithrombine intacte. Pour compenser l'action de celle-ci, le plasma de peptone a parfaitement besoin d'un supplément de cytozyme que les lipoïdes peuvent lui apporter.

Au demeurant, la similitude d'effets entre l'addition de lipoïdes et celle des agents thromboplastiques, qui motive l'opinion de Nolf, ne donne que l'illusion d'une similitude d'action. En fait, la différence saute aux yeux, lorsqu'on se place sur un autre terrain; nous l'avons déjà dit, tandis que les lipoïdes ajoutés à du sérum y font naître, tout comme les plaquettes ou les sucs de tissus, une grande quantité de thrombine, jamais aucun agent thromboplastique, si énergique soit-il, ajouté au sérum le plus riche en sérozyme, ne produira le même effet. Du reste, même en se cantonnant sur le terrain du plasma de peptone, on peut se rendre compte, ainsi que le prouve l'expérience suivante, de la différence qui sépare les lipoïdes des agents thromboplastiques.

Expérience I. — On récolte du plasma de peptone faible. On en abandonne une portion à la sédimentation spontanée, tandis que l'on centrifuge le reste énergiquement. On divise, à son tour, le plasma centrifugé en deux parties : l'une qu'on laisse telle quelle et l'autre qu'on filtre sur bougie Berkefeld, et dont on ne recueille que les 5 premiers centimètres cubes. L'on obtient ainsi trois plasmas, dont le premier (plasma sédimenté) est riche en cellules, le second (plasma centrifugé) est pauvre en cellules et le troisième (plasma filtré) en est totalement dépourvu. Additionnés de deux volumes d'eau distillée, le plasma sédimenté se coagule en une heure, le plasma centrifugé en trois heures, et le plasma filtré pas du tout. Soumis à un courant d'anhy-

dride carbonique, le plasma sédimenté se coagule en dix minutes, le plasma centrifugé en dix-sept minutes et le plasma filtré reste indéfiniment fluide.

Arrêtons-nous à cette première partie de l'expérience pour constater que, contrairement à l'opinion de Wooldridge et conformément à ce qu'ont soutenu la plupart des auteurs, tels que Fano, Athanasiu et Carvallo, un plasma de peptone est d'autant plus apte à se coaguler sous l'influence des agents thromboplastiques qu'il est plus riche en cellules, c'est-à-dire en cytozyme.

Nous venons de voir que l'eau distillée et l'anhydride carbonique sont impuissants à faire coaguler un plasma de peptone privé de cytozyme par la filtration; il est à prévoir qu'ils redeviendront efficaces dès qu'on rendra au plasma de peptone filtré, du cytozyme et, notamment, des lipoïdes, s'il est bien exact que les lipoïdes sont du cytozyme, comme le pensent Bordet et Delange. Et c'est bien ce que la suite de notre expérience vérifie.

Reprenons le plasma filtré et répartissons-le, à raison de 0,5 cent. cubes par tube, entre deux séries de trois tubes : *a*, *b*, *c* et *a'* *b'* *c'*. Dans *a* et *b*, on verse 1 cent. cube d'eau distillée et dans *c* 1 cent. cube d'eau physiologique; on ajoute de plus à *b* et à *c*, une goutte d'une émulsion diluée de lipoïdes : *a* et *c* restent fluides, *b* se coagule en une heure.

a' et *b'* sont soumis à un courant d'anhydride carbonique, *c'* à un courant d'air; on ajoute une goutte de lipoïdes à *b'* et à *c'* : *a'* et *c'* restent fluides, *b'* se coagule en quinze minutes.

	AGENTS THROMBOPLASTIQUES	LIPOÏDES	TEMPS DE COAGULATION
a	Eau distillée, 1 cent. cube	»	∞ (1)
b	Eau distillée, 1 cent. cube	Une goutte.	1 heure.
c	Eau physiologique, 1 cent. cube . .	Une goutte.	∞
a'	Anhydride carbonique.	»	∞
b'	Anhydride carbonique.	Une goutte.	15 minutes.
c'	Air	Une goutte.	∞

(1) Le signe ∞ signifie : reste indéfiniment fluide.

Ainsi donc, l'eau distillée et l'anhydride carbonique ne peuvent faire coaguler le plasma de peptone qu'au prorata de sa teneur en cytozyme. Et lorsque, à la suite de la filtration, le

plasma de peptone a perdu, en même temps que son cytozyme, toute aptitude à se coaguler sous l'action des agents thromboplastiques (*a* et *a'*), il la récupère dès qu'on l'additionne d'une petite quantité de lipoïdes (*b* et *b'*), insuffisante pour avoir un effet coagulant par elle seule (*c* et *c'*). On a nettement l'impression qu'on a restitué au plasma de peptone filtré le cytozyme dont la filtration l'avait privé. Conformément à l'opinion de Bordet et Delange, les lipoïdes remplacent donc bien le cytozyme cellulaire.

Le débat se répète identique, d'ailleurs, au sujet du plasma d'oiseau. L'addition de lipoïdes est capable, en effet, de faire coaguler un plasma stable d'oiseau et ce, d'après Bordet et Delange, parce qu'on lui rend ainsi le quantum de cytozyme nécessaire dont la centrifugation l'avait dépouillé. Pour Nolf, au contraire, les lipoïdes n'ajoutent absolument rien d'indispensable au plasma d'oiseau, puisque l'eau distillée le fait coaguler aussi bien qu'eux. Sans doute, mais encore une fois, ce n'est pas une raison pour identifier les deux mécanismes. Si l'eau distillée fait coaguler le plasma d'oiseau, c'est au prorata de la teneur du plasma en cytozyme. L'on peut, en effet, observer que l'eau distillée fait d'autant moins bien coaguler le plasma d'oiseau que celui-ci a été mieux récolté, c'est-à-dire qu'il contient moins de cytozyme libre. Aussi, peut-on croire qu'un plasma d'oiseau, idéalement privé de cytozyme (1), resterait complètement indifférent à l'addition d'eau distillée. Voici du reste une expérience dans laquelle nous nous rapprochons très fort de cet idéal.

Expérience II. — En suivant la technique de Delezenne, j'ai obtenu récemment un plasma dont un échantillon, conservé en tube stérile, était encore fluide et stérile après un mois. Additionné de deux volumes d'eau distillée, ce plasma se maintenait fluide pendant deux jours et ce n'est que le troisième jour qu'il présentait au ménisque supérieur un petit anneau de fibrine, qui ne s'est d'ailleurs pas étendu au restant de la masse. Si, au contraire,

(1) Il est très difficile, je dirai même impossible, de récolter du plasma d'oiseau idéalement dépourvu de cytozyme libre. On conçoit qu'il doit toujours être un peu souillé, soit au contact de la plaie artérielle au cours de la saignée, soit par ce qui s'échappe des leucocytes au cours de la centrifugation. Ces traces de cytozyme, insuffisantes pour permettre la coagulation spontanée du plasma d'oiseau, deviennent suffisantes lorsque l'addition d'eau distillée diminue la concentration saline et réalise ainsi des conditions beaucoup plus favorables au processus.

en même temps que l'eau distillée, on ajoutait une goutte de lipoïde, l'on provoquait une coagulation massive en quinze minutes.

Ce plasma d'oiseau qui, en raison de sa pauvreté en cytozyme, n'avait quasi aucune aptitude à se coaguler par l'addition d'eau distillée, l'acquérait aussitôt qu'on y ajoutait un peu de lipoïdes. Ici encore, on avait bien l'impression qu'avec cette goutte de lipoïdes, on restituait au plasma d'oiseau ce qui lui manquait, c'est-à-dire le cytozyme cellulaire. Comme le plasma de peptone filtré de l'expérience précédente, ce plasma d'oiseau trahit nettement la distinction qu'il y a lieu de faire entre l'action des lipoïdes et celle des agents thromboplastiques. Tandis que les premiers restituent aux plasmas insuffisamment pourvus le cytozyme qui leur manque, les seconds leur viennent tout simplement en aide et leur permettent de tirer parti de leurs maigres ressources. Chacune de ces actions est capable de provoquer la coagulation d'un plasma stable, mais à sa façon. Et l'effet particulièrement efficace qu'on obtient par leur association ne résulte pas de deux actions similaires qui s'additionnent, mais bien plutôt de deux actions différentes qui se complètent. Déjà Wooldridge réalisait sans s'en douter une semblable association, lorsque, ne parvenant pas à faire coaguler un plasma de peptone fort par la simple addition d'eau distillée, il renforçait l'action de cette dernière par de la lécithine. Une telle combinaison de lipoïdes et d'agents thromboplastiques se trouve d'ailleurs spontanément réalisée dans les sucs de tissus. Outre le cytozyme lipoïdique thermostabile, ces derniers contiennent encore des substances thermolabiles à propriétés thromboplastiques très nettes. C'est pourquoi d'ailleurs le chauffage à 60°, qui ne laisse subsister que le cytozyme, diminue notablement l'activité des sucs de tissus. C'est précisément grâce à cette association que les sucs de tissus font si facilement coaguler les plasmas stables tels que le plasma d'oiseau et le plasma de peptone.

* * *

Pour être complet, il resterait encore à parler de la coagulation du plasma de peptone par le Staphylocoque, que j'ai pu réaliser au cours de mes recherches sur l'action coagulante de

ce microbe (1). Mais c'est là un mécanisme trop spécial qui n'est d'ailleurs pas encore tout à fait élucidé. Aussi, dans la crainte de compliquer le présent exposé, je ne m'arrêterai pas davantage sur cette question à laquelle je me réserve de consacrer un autre mémoire.

CHAPITRE IV

L'ANTITHROMBINE DU PLASMA DE PEPTONE

L'antithrombine à laquelle le plasma de peptone doit son incoagulabilité est un principe non dialysable et résistant à la chaleur, tout au moins jusqu'à 60°. On ne possède encore que peu d'indications sur sa nature chimique. Pourtant Doyon, Morel et Policard, en soumettant le plasma de peptone au bain-marie bouillant, précipitent ensuite par l'acide acétique dilué, dans le liquide séparé des matières albuminoïdes coagulées par la chaleur, un nucléoprotéide contenant 3 p. 100 de phosphore et capable d'empêcher, *in vitro*, le sang de se coaguler. Ils peuvent également extraire de tous les tissus la même substance anticoagulante qui proviendrait, selon ces auteurs, des noyaux cellulaires des organes. Doyon a trouvé de plus que le sel de soude de tous les acides nucléiniques, quelle que soit leur origine, possède le pouvoir d'empêcher le sang de coaguler et s'oppose à l'action de la thrombine. Il nous est encore tout à fait impossible de dire jusqu'à quel point ces produits sont en relation avec l'antithrombine.

Selon une opinion émise par Dastre et Floresco (2) et reprise plus tard par Mellanby (3), l'antithrombine du plasma de peptone ne serait rien d'autre qu'un excès d'alcali déversé par le foie dans la circulation au moment du choc propeptonique. Ainsi s'expliquerait très simplement pourquoi les acides et notamment un courant de CO^2 font coaguler le plasma de peptone. Malheureusement, on n'a jamais réussi à montrer une différence d'alcalinité quelconque entre le plasma de peptone et le plasma normal. Mellanby explique ce fait en

(1) A. Gratia. *C. R. Soc. de Biol.*, 1920.
(2) Dastre et Floresco. *Arch. de Physiol.*, 1897, p. 216-228.
(3) Mellanby. *Journ. of Physiol.*, 1909, **38**, 485.

supposant que le petit excès d'alcali qui suffirait à maintenir la fluidité dans le plasma de peptone se fixe en majeure partie sur les globulines du plasma et échappe par conséquent aux méthodes ordinaires de dosage.

D'après ses calculs, Mellanby estime que l'excès d'alcali du plasma de peptone devrait correspondre à une solution 1/160 N de soude caustique dont, en défalquant la portion fixée, il ne resterait à l'état libre qu'une alcalinité égale à 1/500 N. Pour ma part, en dosant la quantité d'acide chlorhydrique nécessaire pour faire coaguler le plasma de peptone, j'ai pu conclure que l'excès d'alcali, cause présumée de l'incoagulabilité, correspondrait à une solution 1 p. 100 N de NaOH. Cette quantité, surtout si elle se fixe sur les globulines, pourrait peut-être échapper aux méthodes titrimétriques ordinaires, mais elle se révélerait par contre avec la plus grande netteté par la méthode colorimétrique de Mac Marriott qui permet le dosage de la réserve alcaline du plasma sanguin. Grâce à cette méthode (1), j'ai pu, en effet, mettre en évidence très facilement, dans du plasma normal, des traces de soude caustique n'excédant pas une concentration de 1/500 N que j'y avais ajoutées. Or, n'ayant pas réussi, par contre, à montrer la moindre différence d'alcalinité entre le plasma de peptone et le plasma normal, force m'est donc de rejeter l'hypothèse de Mellanby.

Une question qu'il est peut-être utile de résoudre, est de savoir si l'antithrombine est susceptible d'être adsorbée par le précipité colloïdal de phosphate tricalcique. L'expérience suivante, instituée dans ce but, nous montre que du plasma de peptone traité par une grosse quantité de phosphate tricalcique perd une grande partie de ses propriétés anticoagulantes.

Expérience III. — On saigne un chien cinq minutes avant, puis cinq minutes après une injection intraveineuse brusque de 0 gr. 3 de peptone de Witte par kilo. A chacune des deux saignées, on procède de façon identique : on récolte 9 volumes de sang dans 1 volume d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 100 (sang oxalaté à 2 p. 1.000), puis on recueille 9 volumes de sang dans un second tube contenant 1 volume d'une suspension très épaisse de phosphate tricalcique (sang phosphaté). On a soin de remuer chaque fois les

(1) Je tiens à remercier vivement M. Zunz d'avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à ces dosages. Sa grande pratique de la méthode m'a été d'un secours précieux et m'est un sûr garant de l'exactitude de mes résultats.

mélanges pour qu'ils soient bien homogènes. On centrifuge pendant une à deux heures les deux échantillons de sang oxalaté, tandis qu'on laisse reposer les deux tubes de sang phosphaté, qu'on centrifuge ensuite à leur tour. Après avoir décanté les quatre plasmas, on dilue les deux plasmas oxalatés à l'aide de quatre volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. Quant aux deux plasmas phosphatés, lesquels sont encore calcifiés, on les dilue d'abord d'un volume d'eau physiologique oxalatée à 4 p. 1.000, puis de 3 volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. On obtient ainsi quatre plasmas dilués oxalatés à 2 p. 1.000, savoir : du plasma normal, du plasma normal phosphaté, du plasma de peptone et du plasma de peptone phosphaté. Ayant d'autre part préparé de la thrombine de Howel, on fait les mélanges suivants : à 0 c.c. 5 de chacun des quatre plasmas oxalatés dilués, on ajoute de la thrombine, à raison de 0 c.c. 2 dans une première série, de 0 c.c. 5 dans une deuxième série et de 1 cent. cube dans une troisième. On lira dans le tableau ci-dessous les temps de coagulation de chacun des plasmas selon les doses de thrombine.

PLASMAS OXALATÉS DILUÉS (0 c.c. 5)	THROMBINE		
	0 c.c. 2	0 c.c. 5	1 c.c.
Plasma normal	6′	4′	1′
Plasma normal phosphaté	5′	3′	1′
Plasma de peptone	∞	∞	∞
Plasma de peptone phosphaté	30′	12′	6′

A doses égales, la thrombine coagule rapidement le plasma normal, plus lentement le plasma de peptone phosphaté et laisse fluide le plasma de peptone non phosphaté. Le phosphate a donc entraîné l'antithrombine du plasma de peptone, mais de façon incomplète.

Il faut conclure de cette expérience que l'antithrombine du plasma de peptone est partiellement adsorbable par de grandes quantités de phosphate tricalcique.

L'hirudine et le plasma hirudiné.

J'ai utilisé dans mes recherches l'hirudine du commerce. Elle se présente sous la forme de petites paillettes brunâtres, facilement solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool. Elle n'est pas dialysable et son activité résiste au chauffage à 60°.

Il suffit d'un milligramme de cette substance, dissous dans

1 cent. cube d'eau physiologique, pour empêcher la coagulation de 7 cent. cubes de sang. Le plasma hirudiné qu'on obtient ainsi est très stable. Il se coagule, lorsqu'on l'additionne de quantités suffisantes, soit de thrombine, soit de cytozyme (sucs de tissus ou lipoïdes). Mais à l'inverse du plasma de peptone, il résiste énergiquement aux agents thromboplastiques tels que l'eau distillée ou les acides. Cette indifférence du plasma hirudiné aux agents thromboplastiques, qui, remarquons-le, établit une nouvelle distinction entre ceux-ci et les lipoïdes, se vérifie quelle que soit la dose, même faible, d'hirudine qu'on ait employée.

Expérience IV. — On prépare : 1° du plasma de lapin oxalaté à 1 p. 1.000 (P); 2° une solution physiologique de $CaCl^2$ à 5 p. 1.000 (Ca) dont un volume recalcifie amplement quatre volumes du plasma oxalaté ; 3° différentes solutions d'hirudine (H) dans l'eau physiologique (E. P.); 4° une émulsion de cytozyme lipoïdique (CYT).

A. *Action coagulante du cytozyme lipoïdique.* — On place à 37° les trois tubes suivants dont on note les temps de coagulation :

	c.c.		c.c.	c.c.	
a)	0,4 P.	+	0,1 E. P.	+ 0,1 Ca	= 5;
b)	0,4 P.	+	0,1 H. 2 p. 1.000	+ 0,1 Ca	= ∞;
c)	0,4 P.	+	0,1 H. 2 p. 1.000	+ 0,1 Ca + 1 gte Cyt	= 30′.

B. *Inactivité du* CO^2. — On place à 37° deux séries identiques de tubes contenant chacun du plasma oxalaté recalcifié (P.Ca) et de l'hirudine (H) à doses décroissantes. La seconde série se distingue de la première en ce que le plasma qu'elle contient a été préalablement saturé d'anhydride carbonique. On constate que les deux séries donnent des résultats identiques, ce pourquoi je ne reproduis ci-dessous que la première :

0,5 c.c. P.Ca	+ 0,1 c.c. H	à 2,5	p. 1.000	= ∞	
—	+ —	à 2,25	—	= ∞	
—	+ —	à 2	—	= ∞	
—	+ —	à 1,5	—	= ∞	
—	+ —	à 1,2	—	= coagule imparfaitement	après 30′.
—	+ —	à 1,1	—	= —	— —
—	+ —	à 1	—	= —	en 20′
—	+ —	à 0,75	—	= —	en 15′
—	+ 0,1 c.c. E.P.			= —	en 5′

Disons pour terminer que le staphylocoque fait coaguler le plasma hirudiné comme il fait coaguler le plasma de peptone. Mais c'est là un fait un peu spécial sur lequel nous ne pouvons nous arrêter ici.

L'antithrombine et la genèse de la thrombine.

Les travaux de Haycraft, de Dickinson, de Fuld et Spiro et de Morawitz sur l'hirudine, ceux de Morawitz sur l'antithrombine du plasma de peptone ont nettement établi que ces substances sont capables de neutraliser quantitativement la thrombine. Mais il y a tout lieu de croire qu'elles ont en outre le pouvoir de s'opposer à la genèse même du fibrin-ferment.

Si, en effet, le plasma de peptone contenait de la thrombine toute formée, il n'y aurait pas de raison pour que les agents thromboplastiques (eau distillée, acides, anhydride carbonique, etc...) qui font coaguler le plasma de peptone normal ne fassent pas coaguler le plasma de peptone oxalaté. Or, il n'en est rien. Il semble bien aussi que le plasma hirudiné ne contienne pas de thrombine. Les antithrombines opposent donc une entrave à la formation du fibrin-ferment. Comment faut-il l'expliquer? Nos connaissances sur cette question sont encore actuellement des plus confuses. Pour Pekelharing, l'hirudine empêcherait l'altération des cellules sanguines et la libération des agents coagulants que celles-ci contiennent. Mais voici qu'Aynaud déclare, au contraire, que l'hirudine agglutine et altère fortement les plaquettes. Si l'on acceptait la classification d'Arthus, il faudrait ranger l'hirudine et l'antithrombine du plasma de peptone dans la catégorie des antiprothrombines. Selon Howell, les antithrombines et la céphaline se neutraliseraient mutuellement : les premières seraient donc des anticytozymes. Enfin, Bodong pense que l'hirudine modifie la constitution du fibrinogène; elle serait donc un antifibrinogène.

Il importe par conséquent d'éclairer la question à la lumière des faits nouveaux.

CHAPITRE V

ACTION DE L'HIRUDINE SUR LA RÉACTION SÉROZYME-CYTOZYME

Si le plasma hirudiné ne contient pas de thrombine, c'est peut-être que l'hirudine empêche la réaction sérozyme-cytozyme.

Mais comment s'en rendre compte? Je suppose, en effet, qu'un mélange de sérozyme et de cytozyme, opéré en présence d'hirudine, ne fasse pas coaguler le fibrinogène. Comment distinguer si c'est parce que l'hirudine a empêché la réaction sérozyme-cytozyme de se produire, ou bien si c'est parce qu'elle a neutralisé la thrombine issue de la réaction? *A priori* le problème paraît insoluble. Heureusement l'analyse quantitative du phénomène m'a permis d'échapper au dilemme. J'ai, en effet, pu constater qu'une dose d'hirudine, sensiblement inférieure à celle qu'il faut pour neutraliser la thrombine déjà formée, est suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine.

Mais avant d'exposer ces expériences, il importe de rappeler brièvement la technique que j'ai employée de façon constante pour faire la réaction sérozyme-cytozyme de Bordet et Delange.

Comme cytozyme, je me suis servi de l'antigène de Bordet et Ruelens. On évapore cinq gouttes de la solution alcoolique dans un verre de montre et l'on émulsionne l'extrait sec dans 1 cent. cube d'eau physiologique calcifiée (0.35 p. 1.000 $CaCl^2$). Pour préparer le sérozyme, on centrifuge énergiquement du sang de lapin oxalaté à 1 p. 1.000 afin de le dépouiller le plus possible de ses plaquettes. Après avoir décanté le plasma, on le recalcifie à l'aide de 4 volumes d'EP. Ca (1). La petite quantité de cytozyme qu'il contient ne réagit qu'avec une petite quantité de sérozyme pour donner une petite quantité de thrombine qui fait coaguler lentement le plasma. Si on défibrine à ce moment, on obtient un sérum contenant un peu de thrombine et tout le sérozyme qui n'a pas été consommé. La thrombine disparaissant par vieillissement, le lendemain le sérum ne contiendra plus que le sérozyme et sera prêt à servir.

La stabilité de ce sérozyme peut varier d'une espèce animale à l'autre. Il est assez fragile chez le cobaye et chez le chien; abandonné à la température ordinaire, le sérum de ces animaux est sensiblement affaibli du jour au lendemain et après quelques heures de séjour à 37° il peut perdre toute activité.

(1) EP. Ca: Eau physiologique contenant 0,35 p. 1.000 de $CaCl^2$ de sorte que quatre volumes de cette solution recalcifient amplement un volume de plasma oxalaté à 1 p. 1.000.

Le sérozyme de lapin, au contraire, est beaucoup plus résistant et j'ai pu en conserver un stock parfaitement actif pendant plusieurs semaines en le congelant. Il suffit pour cela de maintenir le tube de sérum dans un vase de Dewar dans lequel on entretient un mélange réfrigérant à l'aide de glace et de NaCl.

Lorsqu'on mélange cinq gouttes de sérum riche en sérozyme et une goutte de l'émulsion de cytozyme lipoïdique, on obtient en moins de trois minutes une quantité constante de thrombine capable de faire coaguler très rapidement cinq gouttes de plasma dioxalaté (1).

Expérience V. — Ayant préparé du plasma dioxalaté de lapin (F), du sérum de lapin riche en sérozyme (S) et une émulsion de cytozyme (Cyt.), on fait encore au moment de l'expérience une solution initiale d'hirudine contenant 1 milligr. de cette substance pour 1 cent. cube d'eau physiologique (H 1/1.000) et à partir de laquelle on pourra faire à volonté d'autres solutions plus diluées.

Il s'agit d'abord de rechercher une solution d'hirudine exactement assez diluée pour qu'une goutte de cette solution ne soit plus capable de neutraliser la thrombine produite par la réaction de cinq gouttes de sérozyme avec une goutte de cytozyme.

(5 gouttes	S + 1	goutte Cyt.)	3' + 1	goutte E. P.	+ 5	gouttes	F = $\downarrow$ 1'
(5	— S + 1	—	3' + 1	—	H 1/1.000 + 5	—	F = ∞
(5	— S + 1	—	3' + 1	—	H 1/2.000 + 5	—	F = ∞
(5	— S + 1	—	3' + 1	—	H 1/2.500 + 5	—	F = ∞
(5	— S + 1	—	3' + 1	—	H 1/2.800 + 5	—	F = $\downarrow$ 10'
(5	— S + 1	—	3' + 1	—	H 1/3.000 + 5	—	F = $\downarrow$ 3'

La solution d'hirudine recherchée est donc intermédiaire entre une solution au 1/2.500, dont une goutte neutralise encore complètement six gouttes de thrombine toute fraîche, et une solution au 1/2.800 qui n'a plus ce pouvoir.

Ce point étant établi, on recherche immédiatement après, avec le même matériel, si la dose d'hirudine, trop faible pour empêcher l'action coagulante de la thrombine toute faite, n'est

(1) On prépare le plasma dioxalaté employé en guise de fibrinogène comme réactif de la thrombine, en diluant du plasma oxalaté à 1 p. 1.000 à l'aide de quatre volumes d'eau physiologique oxalatée à 2 p. 1.000. Il contient ainsi suffisamment d'oxalate pour précipiter son propre calcium et celui de la thrombine qu'on y ajoute.

pas suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine.

Expérience VI.

(5	gouttes	S + 1	goutte	H 1/2.500	+ 1	goutte Cyt.)	5′ + 5	gouttes	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/2.800	+ 1	—	5′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/5.000	+ 1	—	5′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/10.000	+ 1	—	5′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/20.000	+ 1	—	5′ + 5	—	F = ↓ 10′

Cette expérience tout à fait concluante nous montre que, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/10.000 est encore suffisante pour entraver la production de la thrombine, alors qu'il faut une solution au 1/2.500, au moins, pour neutraliser la thrombine formée. Il est ainsi nettement prouvé que l'antithrombine non seulement s'oppose à l'action de la thrombine, mais encore qu'elle paralyse sa genèse en entravant la réaction sérozyme-cytozyme.

Mais cette entrave est-elle absolue, en d'autres termes empêche-t-elle complètement la réaction de se produire, ou bien ne lui apporte-t-elle qu'un simple retard, et dans ce dernier cas quelle en est la durée?

Normalement, comme nous le savons, la réaction s'opère en moins de trois minutes; l'expérience VI nous montre qu'en présence d'une goutte d'hirudine au 1/5.000 elle n'a pas encore produit de thrombine après cinq minutes. Mais soyons plus patient, attendons plus longtemps avant d'arrêter la réaction par l'addition du plasma dioxalaté et voyons si après un certain temps il ne se produira pas, malgré tout, de la thrombine active.

Expérience VII. — (Faite immédiatement après la précédente et avec le même matériel) :

(5	gouttes	S + 1	goutte	H 1/5.000	+ 1	goutte Cyt.)	5′ + 5	gouttes	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/5.000	+ 1	—	10′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/5.000	+ 1	—	15′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/5.000	+ 1	—	20′ + 5	—	F = ∞
(5	—	S + 1	—	H 1/5.000	+ 1	—	25′ + 5	—	F = ↓ 5′

En présence d'une goutte d'hirudine au 1/5.000, la réaction sérozyme-cytozyme s'est faite en vingt-cinq minutes, au lieu de trois minutes.

Une dose d'hirudine, insuffisante pour neutraliser complètement de la thrombine déjà formée, n'est pas capable d'arrêter de façon radicale la réaction sérozyme-cytozyme qui produit cette même quantité de thrombine, mais elle la retarde notablement. Il est vraisemblable que des doses un peu plus élevées la paralyseraient complètement.

En présence d'une petite quantité d'hirudine, la réaction sérozyme-cytozyme, simplement retardée, finit donc par triompher de cette hirudine; mais de quelle façon? L'hirudine serait-elle à la longue neutralisée, soit par le sérozyme, soit par le cytozyme lipoïdique? C'est, en effet, comme nous l'avons déjà dit plus haut, l'opinion de Howell que les lipoïdes neutralisent chimiquement l'hirudine. Nous allons pouvoir nous rendre compte très aisément s'il en est bien ainsi par l'expérience suivante faite toujours avec le même matériel. Il suffira pour cela de voir si l'hirudine, qui est vaincue au bout d'un certain temps par l'action synergique du sérozyme et du cytozyme, peut être neutralisée au bout du même temps au contact soit du sérozyme seul, soit du cytozyme seul.

Expérience VIII.

(5 gouttes S + 1 goutte H 1/5.000 + 1 goutte Cyt.) 183′ + 5 gouttes F = ↓ 15′
(5 — S + 1 — H 1/5.000) 180′ + 1 goutte Cyt. 3′ + 5 — F = ∞
(5 — Cyt. + 1 — H 1/5.000) 180′ + 5 gouttes S 3′ + 5 — F = ∞

On voit donc que le cytozyme seul, pas plus d'ailleurs que le sérozyme seul, ne peut neutraliser l'hirudine. Pour vaincre celle-ci, il ne suffit pas de l'une ou de l'autre de ces substances coagulantes, il faut le concours des deux. Il ne s'agit pas, comme le pense Howel, d'une neutralisation chimique de l'hirudine par le cytozyme lipoïdique; c'est le résultat du conflit entre deux actions de sens opposés; c'est la force de cohésion tendant à unir le cytozyme au sérozyme qui triomphe de l'action dispersante de l'hirudine.

Dans les expériences précédentes, nous avons toujours opéré la réaction sérozyme-cytozyme avec une quantité de cytozyme déterminée, assez forte d'ailleurs. Dans ces conditions, si nous appelons *limite maxima* la dose d'hirudine nécessaire pour neutraliser la thrombine toute faite, et *limite minima* la dose d'hirudine suffisante pour entraver la réaction sérozyme-

cytozyme, nous constatons que la première s'établit entre une solution d'hirudine au 1/2.500 qui neutralise complètement la thrombine, et une solution d'hirudine au 1/2.800 qui ne la neutralise plus complètement. Quant à la limite minima, nous voyons qu'elle est intermédiaire entre une solution d'hirudine au 1/10.000 qui entrave encore la réaction et une solution au 1/20.000 qui ne l'entrave plus.

Que deviennent ces limites, si nous faisons varier les quantités de cytozyme employées dans la réaction sérozyme-cytozyme?

Expérience IX. — Utilisons toujours le même matériel que dans les expériences précédentes, à cela près que l'émulsion de cytozyme est diluée au 1/20. Dans ce cas, nous constatons que les limites susdites diminuent notablement. La limite maximale s'établit, en effet, entre 1/10.000 et 1/20.000, et la limite minimale entre 1/40.000 et 1/80.000.

Par conséquent, lorsqu'on diminue la quantité de cytozyme qu'on emploie dans la réaction sérozyme-cytozyme, les quantités d'hirudine nécessaires, soit pour neutraliser la thrombine que produit la réaction, soit pour entraver la réaction elle-même, diminuent en conséquence. Cette corrélation n'implique nullement une neutralisation mutuelle de l'hirudine et du cytozyme. Il va de soi qu'ayant modifié un facteur de condensation, le cytozyme, il faut, pour rétablir la balance, modifier concurremment le facteur de dispersion, l'hirudine. Il est à prévoir que les quantités limites d'hirudine varieront aussi si l'on modifie la quantité ou la qualité du sérozyme employé dans la réaction. Je n'ai pas fait d'expériences dans ce sens, cependant ayant répété deux jours de suite dans des conditions identiques les mêmes mensurations avec le même sérum de chien, j'ai obtenu le second jour des limites sensiblement inférieures à celles de la veille. C'est que le sérozyme du chien étant assez labile, son activité était beaucoup plus faible le second jour que le premier et ne pouvait donc former autant de thrombine que la veille. En somme, l'on peut dire que la limite supérieure d'hirudine varie avec la quantité de thrombine formée, et la limite inférieure, avec la quantité de thrombine susceptible de se former et que j'appellerais volontiers la *thrombine latente*.

CHAPITRE VI

ACTION DE L'ANTITHROMBINE DU PLASMA DE PEPTONE SUR LA RÉACTION SÉROZYME-CYTOZYME

Le plasma de peptone ne contient pas de thrombine puisque les agents thromboplastiques qui font coaguler le plasma de peptone normal sont sans effet sur le plasma de peptone oxalaté.

Comme l'hirudine, l'antithrombine s'oppose donc à la genèse de la thrombine. Aussi faut-il prévoir qu'elle se comportera de la même façon que l'hirudine vis-à-vis de la réaction sérozyme-cytozyme. Et c'est ce que l'expérience vérifie. On observe, en effet, que si l'on fait plusieurs dilutions d'antithrombine, il existe à ces dilutions une limite maxima nécessaire pour neutraliser la thrombine toute faite, et une limite minima suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

Expérience X. — On prépare du plasma dioxalaté de chien (F), du sérum de chien riche en sérozyme (S), une émulsion de cytozyme lipoïdique (Cyt.), et enfin du plasma de peptone (P.P.) récolté 10′ après l'injection brusque de peptone de Witte à raison de 0 gr. 3 par kilo dans la jugulaire d'un chien. Au cours de l'expérience on fera, à l'aide d'eau physiologique (E.P.), les dilutions de plasma de peptone qu'on désire.

(5 gouttes	S + 1	goutte	Cyt.) 3′ +	1	goutte	E.P.	+ 5	gouttes	F =	↓ 1′
(5	—	S + 1	—	3′ +	—	P.P.	+ 5	—	F =	∞
(5	—	S + 1	—	3′ +	—	1/2 P.P.	+ 5	—	F =	∞
(5	—	S + 1	—	3′ +	—	1/3 P.P.	+ 5	—	F =	∞
(5	—	S + 1	—	3′ +	—	1/4 P.P.	+ 5	—	F =	↓ 3′

La limite maxima, c'est-à-dire la plus petite dose d'antithrombine encore capable de neutraliser la thrombine toute faite, est donc intermédiaire entre la dilution du plasma de peptone au tiers et la dilution au quart.

Voyons quelle sera la limite minima, c'est-à-dire la dilution d'antithrombine encore suffisante pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

Expérience XI.

(5 gouttes	S + 1	goutte	1/4 P.P. + 1	goutte Cyt.)	3′ + 5	gouttes	F =	∞
(5	—	S + 1	—	1/10 P.P. + 1	—	3′ + 5	—	F =	∞
(5	—	S + 1	—	1/15 P.P. + 1	—	3′ + 5	—	F =	↓ 5′

La limite minima est donc un peu supérieure à la dilution au 1/15.

Dans quelle mesure l'antithrombine entrave-t-elle la réaction sérozyme-cytozyme? Produit-elle un arrêt radical de la réaction ou simplement un retard?

EXPÉRIENCE XII.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. 1/4 + 1 goutte Cyt.)	3′	+ 5 gouttes	F = ∞
(5 — S + 1 — P.P. 1/4 + 1 —	60′	+ 5 —	F = ∞
(5 — S + 1 — P.P. 1/4 + 4 —	14 h.	+ 5 =	F ↓ 10′

Il s'agit donc bien d'un retard et non pas d'un arrêt définitif de la réaction.

En somme, l'antithrombine du plasma de peptone nous permet de reproduire exactement les expériences que nous avons pu réaliser avec l'hirudine. Il semble donc que le mode d'action de ces deux substances anticoagulantes soit de même nature. Selon toute vraisemblance, nous obtiendrons les mêmes résultats avec d'autres antithrombines, telles qu'on en trouve dans la tête du sclérostome, de l'anchylostome, de la tique (ixodes ricinus), dans l'hépatopancréas de l'écrevisse, etc.

L'anhydride carbonique a sur le plasma de peptone un effet coagulant tout à fait remarquable. Il était tout naturel de se demander ce qu'il adviendrait des expériences précédentes, si on les répétait avec de l'antithrombine saturée d'anhydride carbonique. Mais pour ce faire, nous ne pouvons plus employer comme source d'antithrombine du plasma de peptone normal, puisque, traité par l'anhydride carbonique, il se coagulerait. Il est indispensable de le soumettre préalablement au chauffage à 60° qui détruit le fibrinogène et le sérozyme tout en ménageant l'antithrombine. Nous obtenons ainsi une solution d'antithrombine que nous pouvons saturer d'anhydride carbonique afin d'étudier ce que devient son pouvoir anticoagulant.

EXPÉRIENCE XIII. — On divise du plasma de peptone chauffé une demi-heure à 60° en deux portions, l'une qu'on maintient telle quelle (P.P. chauffé), et l'autre qu'on sature d'anhydride carbonique (P.P. chauffé CO^2). Puis à l'aide de sérum de chien riche en sérozyme (S), d'une émulsion de cytozyme lipoïdique (Cyt.) et de plasma dioxalaté (F), on fait les mélanges suivants :

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.)	3′ + 1 goutte E. P.	+ 5 gouttes	F = ↓ 1′
(5 — S + 1 —	3′ + 1 — P.P. chauffé	+ 5 gouttes	F = ∞
(5 — S + 1 —	3′ + 1 — P.P. chauffé CO^2	+ 5 gouttes	F = ↓ 8′

Saturée d'anhydride carbonique, l'antithrombine perd donc en grande partie son pouvoir de neutraliser la thrombine. S'agit-il d'une altération définitive de l'antithrombine? Pour le savoir, une demi-heure après avoir saturé, à l'aide d'anhydride carbonique, le plasma de peptone chauffé, chassons l'acide par un courant d'air et répétons l'expérience.

Expérience XIV.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) 3′ + 1 goutte P.P. chauffé + 5 gouttes F = ∞
(5 — S + 1 — 3′ + 1 — P.P. chauffé CO^2 + 5 — F = ↓ 10′
(5 — S + 1 — 3′ + 1 — P.P. chauf. (CO^2) + 5 — F = ∞
↘

Avec la disparition de l'anhydride carbonique, l'antithrombine récupère tout son pouvoir anticoagulant. Elle n'avait donc subi aucune altération organique définitive. Nous retrouvons d'ailleurs le même fait à propos de l'entrave à la réaction sérozyme-cytozyme.

Expérience XV. — Cherchons d'abord une dose d'antithrombine qui ne neutralise plus la thrombine toute faite, mais entrave encore la réaction sérozyme-cytozyme.

(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) 3′ + 1 goutte E. P. + 5 gouttes F = ↓ 1′
(5 — S + 1 — 3′ + 1 g. P.P. chauffé + 5 — F = ∞
(5 — S + 1 — 3′ + 1 g. P.P. chauffé 1/2 + 5 — F = ↓ 6′
(5 — S + 1 g. P.P. chauffé 1/2 + 1 goutte Cyt.) 3′ + 5 — F = ∞

Le plasma de peptone chauffé, dilué de moitié, répond donc aux conditions. Nous le traitons par l'anhydrique carbonique et nous constatons qu'il perd son pouvoir d'entraver la réaction.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. chauffé 1/2 CO^2 + 1 goutte Cyt.) 3′ + 5 gouttes F = ↓ 5′

Mais une demi-heure plus tard chassons l'anhydride carbonique par un courant d'air et nous voyons l'action empêchante renaître.

(5 gouttes S + 1 goutte P.P. chauffé 1/2 (CO^2) + 1 goutte Cyt.) 3′ + 5 gouttes F = ↓ ∞
↘

Ces observations sont à rapprocher d'un fait analogue que nous avions déjà pu constater antérieurement. Nous avons vu (expérience I) que du plasma de peptone filtré (P. P. F.) qui restait fluide malgré l'addition soit d'anhydride carbonique seul, soit d'un peu de cytozyme seul, se coagulait facilement par l'action simultanée de ces deux facteurs. A la suite de cette observation nous avions aussitôt institué l'expérience suivante.

Expérience XVI. — Un tube A contient 0 c.c. 5 de P.P. F pur + 1 goutte de cytozyme lipoïdique dilué : il ne coagule pas. Un tube B contient

0 c.c. 5 de P.P.F qu'on vient de saturer d'anhydride carbonique : il ne coagule pas. Un tube C contient à la fois 0 c.c. 5 d'anhydride carbonique et une goutte de cytozyme : il coagule en 15 minutes. Deux tubes D et E contiennent chacun 0 c.c. 5 de P.P. F saturé d'anhydride carbonique; on les bouche hermétiquement et l'on attend une demi-heure pour permettre à l'anhydride carbonique d'exercer son action éventuelle sur le plasma. Ce laps de temps écoulé, on chasse l'anhydride carbonique du tube E par un courant d'air, puis on ajoute à D et à E une goutte de cytozyme lipoïdique dilué. D coagule en 15 minutes, E ne coagule pas; il se comporte de la même façon que A, c'est-à-dire tout à fait comme s'il n'avait jamais été traité par l'anhydrique carbonique.

L'anhydride carbonique ne cause donc pas de modification définitive du plasma; il n'altère pas l'antithrombine. Il agit par sa simple présence au moment où le sérozyme et le cytozyme sont en conflit avec l'antithrombine. Mais il reste difficile de distinguer si ses effets coagulants proviennent de ce qu'il favorise l'union du sérozyme et du cytozyme sans affaiblir l'antithrombine, ou bien, au contraire, s'il réduit l'antithrombine à l'impuissance sans favoriser la réaction sérozyme-cytozyme. Toutefois, étant donné que l'anhydride carbonique n'a aucune action, ni sur le plasma normal, ni sur le plasma d'oiseau, ni sur le plasma hirudiné et que son action est en somme élective pour le plasma de peptone, c'est la seconde hypothèse qui paraît la plus vraisemblable. Le plasma de peptone traité par l'anhydride carbonique se coagule tout à fait comme un plasma normal en donnant un sérum riche en thrombine et, par conséquent, privé d'antithrombine. Tout se passe, en somme, comme si l'antithrombine, sans être détruite par l'anhydride carbonique, était en quelque sorte paralysée et sortait ainsi en grande partie du jeu des réactions pour être ensuite neutralisée par la thrombine formée.

CHAPITRE VII

ACTION DE L'HIRUDINE SUR LA TRANSFORMATION DU PROSÉROZYME EN SÉROZYME

Ce qu'il importe surtout de retenir des chapitres précédents, c'est que, même à des doses sensiblement inférieures à celles requises pour neutraliser la thrombine toute faite, l'hirudine et l'antithrombine sont capables d'inhiber la réaction sérozyme-

cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine. En d'autres termes, l'antithrombine entrave davantage la genèse de la thrombine que son action, ce qui explique du reste l'absence du fibrin-ferment dans le plasma de peptone et le plasma hirudiné. Mais en vérité, cette inhibition ne peut-elle pas intervenir de façon plus précoce encore dans le processus de la coagulation du sang ? Bordet et Delange, en effet, ont montré que le plasma n'a pas l'aptitude que possède le sérum de réagir instantanément avec le cytozyme ; il ne réagit, au contraire, que très paresseusement. Le sérozyme ne serait donc pas dans le plasma sous la même forme que dans le sérum, mais bien plutôt à l'état inactif de *prosérozyme*. Il s'ensuit que dans le processus normal de la coagulation du sang, la réaction sérozyme-cytozyme doit fatalement être précédée de la transformation préalable du prosérozyme en sérozyme actif.

En utilisant des méthodes entièrement différentes, Bordet (1) d'une part, et moi-même (2) d'autre part, avons pu constater que cette transformation est normalement soumise à trois facteurs essentiels qui sont : la présence de calcium, la présence de cytozyme et l'action du contact. Il m'a paru indispensable de compléter cette étude en voyant si l'hirudine pouvait également influencer ce stade préliminaire de la coagulation, et notamment, si des doses trop faibles pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme et, *a fortiori*, l'action de la thrombine, ne sont pas suffisantes pour empêcher l'activation du prosérozyme. Dans ce but, nous avons repris la méthode que nous avions déjà imaginée pour rechercher les influences qui conditionnent normalement la transformation du prosérozyme en sérozyme actif, et dont voici le principe.

Nous avions pu constater, par ailleurs, que le Staphylocoque a la singulière propriété de faire coaguler du plasma oxalaté sans utiliser les agents du mécanisme normal de la coagulation que l'on retrouve intacts après la formation du caillot. Si l'on défibrine celui-ci, on obtient, en effet, non pas un sérum, mais un véritable plasma oxalaté contenant encore son cytozyme et son prosérozyme, mais plus de fibrinogène. Lorsqu'on recalcifiera ce « plasma de Staphylocoque », on ne pourra évidem-

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, Octobre 1919.
(2) *C. R. Soc. de Biol.*, **82**, Novembre 1919.

ment plus le faire coaguler, mais on y verra apparaître de la thrombine de façon explosive après un certain temps de latence, précisément lorsque le prosérozyme se sera transformé en sérozyme actif et sera, par conséquent, devenu apte à réagir avec le cytozyme présent ou, à plus forte raison, avec du cytozyme surajouté. Comme on peut très aisément saisir ce moment où le plasma de Staphylocoque recalcifié contient de la thrombine ou, mieux encore, est capable d'en produire instantanément par l'addition d'un peu de cytozyme, nous avons ainsi une méthode fort simple de mesurer la durée de la transformation du prosérozyme en sérozyme actif.

Nous établirons de cette façon d'abord la durée de la transformation dans du plasma de Staphylocoque normal; nous verrons ensuite ce qu'elle devient sous l'influence de minimes quantités d'hirudine.

Expérience XVII. — On place à 37° du plasma de lapin énergiquement centrifugé et ensemencé de Staphylocoques. On ne le retire que six heures plus tard, lorsque tout le fibrinogène est certainement coagulé, et on le défibrine. On recalcifie une prise d'essai de ce plasma de Staphylocoque à l'aide de 4 volumes d'E.P.Ca. Dès ce moment on prélève, toutes les 5 minutes, 5 gouttes de plasma de Staphylocoque recalcifié (P.S.Ca), on y ajoute 1 goutte de cytozyme (Cyt.), on attend 3', puis on verse, comme réactif de la thrombine éventuellement formée, 5 gouttes de plasma dioxalaté (F). On notera à partir de quel prélèvement le plasma de Staphylocoque, additionné de cytozyme, est capable de coaguler le plasma dioxalaté. On saura ainsi à partir de quel moment il a acquis l'aptitude de former de la thrombine en moins de 3 minutes après addition de cytozyme, c'est-à-dire à partir du moment où il contient du sérozyme actif.

DURÉE de la recalcification	
5'	(5 gouttes P.S. Ca + 1 goutte Cyt.) 3' + 5 gouttes F = ∞
30'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = ∞
35'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = ↓ 8'
40'	(5 — + 1 — 3' + 5 — F = ↓ 2'

La transformation du prosérozyme en sérozyme actif exige donc 35 minutes pour s'effectuer dans ce plasma de Staphylocoque normal. Voyons quels résultats nous obtiendrons, si nous répétons l'expérience avec le même plasma de Staphylocoque additionné d'un peu d'hirudine.

Pour cela, préparons cinq solutions d'hirudine dans l'eau physiologique (E.P.) à des titres décroissants, qui dans les conditions habituelles des expériences précédentes n'auraient plus d'effet sur la réaction sérozyme-cytozyme; par exemple, des solutions au 1/10.000, au 1/20.000; au 1/40.000, au 1/80.000 et au 1/200.000. Ensuite, dans six tubes contenant chacun 5 volumes de plasma de Staphylocoque qu'on vient de recalcifier (P.S.Ca), on verse, dans le premier, un volume d'eau physiologique, et dans chacun des cinq autres respectivement un volume d'une des solutions d'hirudine susdites. Il ne reste plus qu'à rechercher l'apparition de sérozyme actif dans chacun des mélanges, c'est-à-dire que toutes les 5 minutes on prélève 6 gouttes de chacun d'eux (P.S.Ca.H.), on y ajoute 1 goutte de cytozyme (Cyt.), on attend 3 minutes, puis on verse 5 gouttes de plasma dioxalaté (F) :

(6 gouttes P.S.Ca.H. + 1 goutte Cyt.) 3′ + 5 gouttes F = ? (1).

Conformément à l'essai préalable fait plus haut, on trouve du sérozyme actif 35 minutes après la recalcification dans le premier mélange qui représente le plasma normal. On n'en trouve pas dans aucun des autres. Ce n'est qu'après 70 minutes qu'on en trouve dans le sixième, c'est-à-dire celui qui contient le moins d'hirudine (H — 1/200.000), qu'après 85 minutes dans le cinquième (H — 1/80.000). Après 100 minutes, il n'y en a pas encore trace dans les autres. Ces résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous où, pour chacun des mélanges, on a marqué du signe + le moment où l'on peut y déceler la présence du sérozyme.

	25′	30′	35′	40′	45′	60′	'70	85′	100′
P.S.Ca + H 1/10.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/20.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/40.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
P.S.Ca + H 1/80.000	—	—	—	—	—	—	—	+	+
P.S.Ca + H 1/200.000.	—	—	—	—	—	—	+	+	+
P.S.Ca + E.P	—	—	+	+	+	+	+	+	+

Tandis qu'il faut, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/2.500 pour neutraliser la thrombine toute faite, une solution au 1/10.000 pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme, il suffit d'une solution au 1/200,000 pour retarder du double la durée de la transformation du prosérozyme et sérozyme.

L'hirudine peut donc manifester ses actions antagonistes aux

(1) Il est à remarquer que pour avoir des résultats comparables on se place dans des conditions identiques à celles des expériences VI à XII : les 6 gouttes de P.S.Ca.H. contiennent en effet 1 goutte d'hirudine (H) et 5 gouttes de plasma de Staphylocoque recalcifié (P.S.Ca) lesquelles correspondent exactement aux 5 gouttes de sérum riche en sérozyme (S) des expériences précédentes. L'émulsion de cytozyme a également la concentration habituelle.

différents stades de la coagulation du sang, et d'une façon d'autant plus intense qu'on la fait intervenir plus précocement dans l'évolution du processus.

CHAPITRE VIII

DE LA SOI-DISANT NEUTRALISATION DE L'ANTITHROMBINE PAR LES LIPOIDES

Il n'est pas, jusqu'à présent, une seule de nos expériences qui ne mette en relief l'opposition du cytozyme et de l'antithrombine.

Le cytozyme tend à s'unir au sérozyme; l'antithrombine l'en écarte. Qu'on renforce le cytozyme et l'écart diminue, qu'on renforce au contraire l'antithrombine et l'écart augmente. Il existe entre ces deux substances un véritable contre-balancement, chacune d'elles étant le contrepoids de l'autre. Mais le véritable soutien de cette balance, c'est le sérozyme. Supprime-t-on celui-ci, aussitôt l'antithrombine et le cytozyme lipoïdique deviennent indifférents l'un à l'autre. C'est ce dont Howell ne tient pas compte lorsque, dans sa théorie, il explique l'antagonisme des lipoïdes et de l'antithrombine par l'existence d'une soi-disant affinité chimique entre ces deux substances qui se neutraliseraient en proportions définies.

Déjà Dale et Walpole (1) n'ont pu vérifier une telle neutralisation en absence de prothrombine (sérozyme). Nous aussi, nous avons déjà montré plus haut (exp. VIII) qu'on ne parvient pas à vaincre l'antithrombine par le cytozyme lipoïdique seul, mais seulement par le concours du cytozyme et du sérozyme. Mais voici des expériences plus directes et plus objectives encore.

Expérience XVIII. — Dans trois tubes *a*, *b*, *c*, on verse du plasma oxalaté de lapin, qu'on vient de recalcifier à raison de 0 c.c. 25 par tube (Pl. ox. Ca). Puis on ajoute au tube *a* 2 gouttes d'eau physiologique (E. P.); au tube *b* 1 goutte d'une solution donnée d'hirudine (H) et 1 goutte d'eau physiologique; au tube *c*, 1 goutte de la même solution d'hirudine et 1 goutte d'une émulsion épaisse de cytozyme lipoïdique (Cyt.). Voici les résultats :

(1) Dale et Walpole. *Bioch. Journ.*, octobre 1916, **10**, n° 3, p. 356.

a) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 2 gouttes E.P = 30′
b) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 1 goutte H + 1 goutte E.P. = ∞
c) — 0 c.c. 25 Pl. ox. Ca + 1 goutte H + 1 goutte Cyt. = 18′

Dans cette expérience, la goutte de cytozyme lipoïdique ajoutée au plasma hiruding du tube *c*, non seulement le fait coaguler, mais encore le fait coaguler plus rapidement que ne coagule le plasma normal du tube *a*; elle est donc plus que suffisante pour neutraliser complètement la goutte d'hirudine. C'est du moins ainsi que cela se passe dans 0 c. c. 25 de plasma normal riche en sérozyme. Si les vues de Howell sont exactes, cette neutralisation doit pouvoir s'effectuer aussi bien dans du plasma privé de sérozyme, tel que du plasma phosphaté. Or ce n'est pas du tout ce que prouve l'expérience suivante.

Expérience XIX. — On reproduit exactement les mêmes mélanges que dans l'expérience précédente, mais en remplaçant le plasma normal par le même plasma préalablement privé de sérozyme, grâce à l'action adsorbante du phosphate tricalcique (Pl. ox. phosph. Ca). On abandonne les trois tubes pendant 2 heures ou davantage, de façon à assurer l'union éventuelle du cytozyme et de l'hirudine. Bien entendu, pendant ce temps, aucun des trois tubes ne peut se coaguler, puisqu'aucun ne contient du sérozyme; mais on pourra en provoquer la coagulation à volonté par l'addition de thrombine toute formée. On ajoute donc, après un certain temps, 5 gouttes de thrombine (1) aux trois mélanges. Le tube *a* se coagule en 10 minutes, le tube *b* qui contient de l'hirudine reste fluide. Quant au tube *c*, qui contient la même quantité d'hirudine, mais également une quantité correspondante de cytozyme, il ne se coagule pas davantage. On répète une seconde fois l'expérience avec une dose double de thrombine : le tube *a* se coagule en 2 minutes; les tubes *b* et *c* se coagulent cette fois, mais en 8 minutes seulement et tous deux en même temps d'ailleurs.

a) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 2 gouttes E.P. 2 h. + 5 g. T = ↓ 10′
b) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. E.P. 2 h. + 5 g. T = ∞
c) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. Cyt. 2 h. + 5 g. T = ∞

a′) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 2 gouttes E.P. 2 h. + 10 g. T = ↓ 2′
b′) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. E.P. 2 h. + 10 g. T = ↓ 8′
c′) — 0 c.c. 25 Pl. ox. phosph. Ca + 1 goutte H + 1 g. Cyt. 2 h. + 10 g. T = ↓ 8′

Ces expériences montrent nettement qu'une quantité de cytozyme plus que suffisante pour neutraliser une certaine dose d'hirudine dans du plasma riche en sérozyme n'est plus du tout capable de neutraliser, ni même d'atténuer cette même dose

(1) Thrombine de Howel, voir plus loin.

d'hirudine si le plasma est privé de sérozyme. Ce n'est donc que par l'intermédiaire de celui-ci que les lipoïdes cytozymiques neutralisent l'antithrombine.

Du reste Howell considère la soi-disant neutralisation de l'antithrombine par les lipoïdes comme une réaction chimique. Or, nous venons de voir que dans 0 c. c. 25 de plasma normal riche en sérozyme, une goutte de notre émulsion de cytozyme triomphe d'une goutte de la solution d'hirudine; il devrait donc toujours en être ainsi à volume égal, quel que soit le volume. Ce n'est pas du tout ce que l'expérience démontre.

Expérience XX. — Si, au lieu d'une goutte d'hirudine, nous en ajoutons 2 à 0 c.c. 25 de plasma oxalaté recalcifié, il ne suffira pas de 2 gouttes de cytozyme lipoïdique pour faire coaguler celui-ci, il en faudra 4 ou 5, et encore la coagulation sera-t-elle lente. Et si c'est 3 gouttes d'hirudine qu'on a employées, le plasma restera définitivement incoagulable ou ne se coagulera qu'avec la plus extrême lenteur, quelle que soit la quantité de cytozyme qu'on ajoutera.

0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes E.P. = ↓ 30′
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 1 goutte H + 1 goutte E.P. = ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 1 goutte H + 1 goutte Cyt. = ↓ 18′
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 2 gouttes E.P. = ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 2 gouttes Cyt. = ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 3 gouttes Cyt. = ∞
0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt. = ↓ 2 heures.

Ces faits ne peuvent s'expliquer par la théorie de Howell. Ils se comprennent très bien, au contraire, si nous admettons que la neutralisation de l'antithrombine est fonction non pas du seul cytozyme lipoïdique, mais également du sérozyme. On conçoit dès lors que si la quantité d'hirudine est trop forte, tout le sérozyme du plasma, même saturé de lipoïdes, ne suffira pas pour triompher de l'hirudine. Cette déduction se vérifie d'ailleurs très facilement.

Expérience XXI. — Un tube contenant 0 c.c. 25 de plasma oxalaté recalcifié, 2 gouttes d'hirudine et 5 gouttes de cytozyme est encore fluide après une heure. Il suffit d'y ajouter 0 c.c. 25 de sérum riche en sérozyme (S) pour en provoquer la coagulation en moins de 5 minutes, alors qu'additionné de 0 c.c. 25 d'eau physiologique, il ne se coagulait péniblement qu'en 2 heures.

(0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt.) 60′ + 0,25 S = ↓ 4′
(0 c.c. 25 Pl. ox. Ca. + 2 gouttes H + 5 gouttes Cyt.) 60′ + 0,25 E.P. = ↓ 2 h.

Dans ce cas-ci, on serait donc tout aussi autorisé à dire que c'est le sérozyme qui neutralise l'antithrombine.

Ces observations, et d'autres encore qu'il nous paraît superflu de décrire, et dans lesquelles on ne peut pas davantage mettre en évidence la soi-disant affinité de l'antithrombine et des lipoïdes, nous confirment dans l'opinion que c'est au contraire en satisfaisant son affinité pour le sérozyme, conformément à la théorie de Bordet et Delange, que le cytozyme lipoïdique parvient à vaincre la résistance de l'antithrombine.

CHAPITRE IX

LA NEUTRALISATION RÉCIPROQUE DE LA THROMBINE ET DE L'ANTITHROMBINE

Nous venons de démontrer que les lipoïdes n'ont aucune aptitude à se combiner avec l'antithrombine. Celle-ci ne peut être réellement neutralisée que par la thrombine résultant de l'union d'une quantité suffisante de sérozyme avec une quantité convenable de lipoïdes cytozymiques.

On sait, en effet, depuis Morawitz, que la thrombine neutralise quantitativement l'antithrombine. Nous nous proposons d'étudier cette réaction et le complexe qu'elle produit. Mais avant cela, disons un mot des substances en jeu, ou plutôt ne parlons plus ici que de la thrombine, puisqu'aussi bien nous avons traité de l'antithrombine et de l'hirudine dans des chapitres précédents.

La thrombine.

Nous avons suffisamment discuté la genèse de la thrombine pour ne plus devoir y revenir ; mais voyons sous quelles formes cet agent peut se présenter et quelle est celle qui convient le mieux pour l'expérimentation.

Nous savons qu'on retrouve la thrombine en plus ou moins grande quantité dans le sérum après la coagulation. C'est évidemment une source qu'on peut utiliser; mais, pour des expériences un peu précises, son emploi est à rejeter, car la richesse des sérums en thrombine est très variable et, de plus, comme cet agent est très labile dans le sérum, son activité faiblit trop rapidement pour donner des résultats comparables.

Il est préférable de recourir à la production extemporanée de thrombine fraîche par la réaction de Bordet et Delange. En mélangeant, dans des conditions toujours identiques, une quantité donnée de sérum riche en sérozyme avec une quantité donnée de cytozyme lipoïdique, on obtient, au bout de trois minutes, une quantité constante de thrombine très active qu'on emploiera instantanément. Comme cette réaction est très rapide et qu'on peut la répéter dans un très grand nombre de tubes à la fois, et à n'importe quel moment, on a ainsi sous la main, quand on le désire, une source de thrombine très pratique et suffisamment constante pour bien des expériences. Nous y avons eu très souvent recours, notamment dans la plupart des expériences précédentes où cette méthode était même obligée.

Une thrombine tout à fait recommandable, en raison de sa stabilité et de son emploi fort pratique, est celle que l'on obtient, à l'instar de Gamgee, en faisant digérer pendant deux ou trois jours, dans une solution de NaCl à 8 pour 100, de la fibrine de porc fraîche et bien lavée. Le liquide visqueux qu'on obtient, filtré, puis dilué de 9 volumes d'eau distillée, donne une solution isotonique de thrombine très active et tout à fait stable. Howell a très ingénieusement perfectionné la méthode en précipitant la thrombine de la solution concentrée et filtrée, à l'aide d'un égal volume d'acétone. Le précipité jaunâtre qu'on obtient est aussitôt étalé, aussi finement que possible, sur du papier filtre et séché dans un courant d'air. La thrombine se conserve ainsi fort bien, à l'état sec. Au moment de s'en servir, il suffit de découper un fragment de ce papier filtre et de le laisser macérer pendant une heure ou deux dans un peu d'eau physiologique pour obtenir une solution active très limpide et que Howell considère, mais à tort, comme une solution pure de thrombine. Ainsi que le montre l'expérience suivante, il est facile de constater que la thrombine de Howell n'est pas pure, mais est au contraire riche en cytozyme.

Expérience XXII. — On prépare du plasma dioxalaté de lapin (F), du sérum riche en sérozyme de lapin (S), de la thrombine de Howell (T), de la thrombine de Howell chauffée à 60° (T chauffée), et l'on fait les mélanges suivants dont on note les temps de coagulation.

a) 0 c.c. 5 T + 0 c.c. 5 E.P. + 1 c.c. F = ↓ 6′
b) 0 c.c. 5 T chauffée + 0 c.c. 5 E.P. + 1 c.c. F = ∞
c) 0 c.c. 5 T chauffée + 0 c.c. 5 S + 1 c.c. F = ↓ 10

Chauffée à 60°, la thrombine de Howell perd son activité (*b*), mais elle conserve son cytozyme, qui est capable de réagir avec le sérozyme du sérum pour donner de la nouvelle thrombine (*c*).

La thrombine de Howell est donc cytozymique et cela se conçoit aisément, puisque la fibrine dont elle provient a entraîné dans ses mailles, au moment de la coagulation, toutes les plaquettes du sang.

La thrombine normale du sérum est au contraire, comme nous le savons, sérozymique, car la coagulation se produisant avant que tout le sérozyme n'ait été consommé, ce qui reste de celui-ci se retrouve dans le sérum. Quant à la thrombine obtenue par la réaction de Bordet et Delange, elle sera sérozymique ou cytozymique, selon que la quantité de cytozyme qu'on aura employée dans la réaction n'aura pas atteint, ou aura au contraire, dépassé la limite de saturation du sérozyme. Comme on en ajoute généralement une assez grande quantité, c'est le second cas qui est la règle.

Aucune des thrombines que l'on peut employer n'est donc strictement pure. C'est une notion dont il faut toujours tenir compte au cours des expériences, pour savoir éviter des causes d'erreur et interpréter les résultats à leur juste valeur.

C'est un fait que la thrombine n'a pas besoin de sels calciques solubles pour coaguler le fibrinogène. On peut cependant se rendre compte par l'expérience suivante qu'elle perd sensiblement de son activité lorsqu'on l'oxalate.

Expérience XXIII. — On filtre une macération de fibrine de porc et on divise en deux portions le liquide visqueux et fortement hypertonique que l'on obtient. L'on dilue l'une de ces portions à l'aide de 9 volumes d'eau distillée pure, et l'autre à l'aide de 9 volumes d'eau distillée oxalatée à 1 p. 1.000. Il se produit dans cette dernière un précipité d'oxalate calcique qu'on laisse se déposer. On possède ainsi deux solutions de thrombine dont l'une est encore calcifiée (T) et dont l'autre est oxalatée (T ox.). Ayant, d'autre part, préparé du plasma dioxalaté de lapin (F), on fait les mélanges suivants, dont on note les temps de coagulation :

a) 0 c.c. 5 T + 0 c.c. 5 F = ↓ 2′
b) 0 c.c. 5 T. ox. + 0 c.c. 5 F = ↓ 10′

Il existe donc une différence notable dans l'activité de la thrombine, selon qu'elle est calcifiée ou oxalatée. Il y a lieu de rappeler, à ce sujet, que Bordet et Delange ont déjà décrit sous le nom d'oxalatation séparée un phénomène fort semblable,

qu'ils avaient réalisé avec de la thrombine issue d'un mélange de sérozyme et de cytozyme.

*
* *

Ces renseignements préliminaires étant établis, revenons-en au véritable objet de nos recherches, à savoir la nature de la neutralisation réciproque de la thrombine et de l'antithrombine.

Existe-t-il réellement entre ces deux substances une affinité, capable de les entraîner dans une combinaison inactive?

Voyons ce que répond l'expérience.

Expérience XXIV. — (Pour la technique, voir Expériences V et VI.) Recherchons une dose d'hirudine capable d'entraver nettement une réaction sérozyme-cytozyme.

(5 gouttes S + 1 goutte E.P. + 1 goutte Cyt.) $3'$ + 5 gouttes F = $\downarrow$ $1'$
(5 — S + 1 — H 1/2.800 + 1 — $3'$ + 5 — F = ∞
(10 — S + 1 — H 1/2.800 + 2 — $3'$ + 5 — F = ∞

En conséquence, 1 goutte d'une solution d'hirudine au 1/2.800 répond bien à nos désirs. Nous neutralisons cette quantité d'hirudine par une quantité convenable de thrombine toute faite, telle que le mélange puisse faire coaguler du fibrinogène.

[(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) $3'$ + 1 goutte H 1/2.800)] + 5 gouttes F = $\downarrow$ $10'$

Mais la thrombine est labile, tandis que l'hirudine est stable. Si on laisse donc vieillir un semblable mélange, l'hirudine soi-disant neutralisée par le fibrin-ferment ne va-t-elle pas se démasquer et redevenir active au fur et à mesure que la thrombine disparaîtra? Il n'en est rien. L'hirudine neutralisée reste neutralisée, même après la mort du fibrin-ferment.

Pour nous en assurer répétons, dans trois tubes *a*, *b*, *c*, le mélange d'hirudine (H) et de thrombine (5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) dans lequel l'hirudine est amplement neutralisée par un excès de thrombine :

[(5 gouttes S + 1 goutte Cyt.) $3'$ + 1 goutte H 1/2.800] = 7 gouttes ($T > H$)

et laissons vieillir 24 heures.

Après ce laps de temps, la thrombine du mélange $T > H$ a complètement disparu :

a) 7 gouttes ($T > H$) + 5 gouttes F = ∞.

Pourtant l'hirudine ne s'est pas démasquée, car le mélange $T > H$ n'a pas récupéré la propriété d'entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

b) (5 gouttes S + 7 gouttes ($T > H$) + 1 goutte Cyt.) $3'$ + 5 gouttes F = $\downarrow$ $5'$.

L'hirudine du mélange n'est pourtant pas détruite, car ce que le vieillissement n'a pu faire, le chauffage à 60° peut le réaliser.

Chauffé à 60° le mélange $T < H$ restitue son hirudine : il redevient capable d'entraver la réaction sérozyme-cytozyme.

c) (5 gouttes S + 7 gouttes (T $<$ H) chauffé 60° + 1 goutte Cyt.) 3′ + 5 g. F = ∞.

Nous observons des faits identiques, en ce qui concerne la neutralisation de l'antithrombine du plasma de peptone.

Expérience XXV. — On commence par vérifier qu'un échantillon de plasma de peptone (P.P.) contient assez d'antithrombine pour empêcher la coagulation d'un égal volume de plasma normal oxalaté recalcifié.

0 c.c. 5 E.P. + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 0 c.c. 2 E.P.Ca. = ↓ 23′
0 c.c. 5 P.P. + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 0 c.c. 2 E.P.Ca. = ∞.

En saturant d'anhydride carbonique ce plasma de peptone, on le fait coaguler en 10 minutes. On le défibrine aussitôt et récolte un sérum (S.P.P.), dont l'antithrombine est complètement neutralisée par l'excès de thrombine qui s'est formée. Ce sérum frais est, en effet, capable de faire coaguler du plasma dioxalaté normal (F) :

0 c.c. 5 S.P.P. + 0 c.c. 5 F = ↓ 12′.

On laisse vieillir le sérum pendant 24 heures, après quoi on vérifie que la thrombine a complètement disparu :

0 c.c. 5 S.P.P. + 0 c.c. 5 F = ∞.

Malgré cela, l'antithrombine neutralisée ne s'est pas libérée, puisque le sérum vieux n'a pas récupéré la propriété d'empêcher la coagulation d'un égal volume d'un plasma normal :

0 c.c.5 E.P. + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ↓ 38′
0 c.c.5 S.P.P. + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ↓ 30′

Mais, chauffé à 60°, le sérum restitue l'antithrombine et redevient capable d'exercer une action anticoagulante :

0 c.c. 5 E.P. + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 2 c.c. 2 E.P.Ca. = ↓ 40′
0 c.c. 5 S.P.P. chauffé 60° + 0 c.c. 5 Pl. ox. + 2 c.c. 2 E.P.Ca. = ∞.

Entre la thrombine et l'antithrombine, il se forme donc un complexe inactif qui résiste au vieillissement, mais se désagrège par le chauffage à 60°.

La thrombine a donc de l'affinité à la fois pour le fibrinogène et pour l'antithrombine. Qu'advient-il, lorsque ces substances se trouvent toutes trois en présence dans le même milieu? La thrombine, pour pouvoir coaguler le fibrinogène, devra-t-elle d'abord avoir complètement neutralisé l'antithrombine, ou bien pourra-t-elle se répartir sur les deux substances simultanément et coaguler une partie du fibrinogène, tout en neutralisant partiellement l'antithrombine? Les expériences suivantes nous donneront la réponse.

Expérience XXVI. — Un plasma de peptone faible donne spontanément, après 36 heures, un caillot très mou. Dans ce cas, évidemment, la coagulation

du fibrinogène s'est opérée dans un mélange de thrombine et d'antithrombine. Or, si l'on défibrine le caillot, l'on constate que le plasma défibriné (P.P.D.) contient encore de l'antithrombine, puisqu'il peut empêcher la coagulation d'un égal volume de plasma normal oxalaté (P. ox.) qu'on a recalcifié.

0 c.c. 5 E.P. + 0 c.c. 5 P. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ↓ 25′
0 c.c. 5 P.P.D. + 0 c.c. 5 P. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ∞.

Expérience XXVII. — On ajoute 2 volumes d'eau distillée à 1 volume de plasma de peptone fort. La coagulation débute 4 heures plus tard et finit par donner un caillot assez ferme. On défibrine et, comme dans l'expérience précédente, on constate que le plasma de peptone défibriné (P.P.D.) contient encore de l'antithrombine (1).

0 c.c. 5 E.P. + 0 c.c. 5 P. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ↓ 38′
0 c.c. 5 P.P.D. + 0 c.c. 5 P. ox. + 2 c.c. E.P.Ca. = ∞.

Lorsque de la thrombine se forme à la longue dans le plasma de peptone, malgré la résistance de l'antithrombine, elle se trouve partagée entre deux sollicitations du fait de son affinité pour le fibrinogène d'une part, et pour l'antithrombine de l'autre. Au lieu que l'une de ces affinités l'emporte totalement sur l'autre, il va se faire un partage des affinités, et l'on verra la thrombine coaguler une plus ou moins grande quantité de fibrinogène avant d'avoir complètement neutralisé l'antithrombine.

Certaines influences, telle que la concentration saline ou la réaction du milieu, peuvent conditionner ce partage d'affinités en favorisant l'une d'elles au détriment de l'autre. C'est ainsi que l'eau distillée, les acides, l'anhydride carbonique, tendant à dissocier la combinaison thrombine-antithrombine en faveur de la combinaison thrombine-fibrinogène, sont capables d'accélérer considérablement la coagulation du plasma de peptone.

Si, au lieu de mettre en présence à la fois la thrombine, le fibrinogène et l'antithrombine, on mélange d'abord la thrombine et le fibrinogène, ils se combinent rapidement pour donner de la fibrine et l'addition subséquente d'antithrombine ne peut plus dissocier la combinaison. Inversement, lorsqu'on ajoute du fibrinogène à un mélange tout récent de thrombine et d'antithrombine, le fibrinogène peut encore parfois soustraire un

(1) Il n'en est cependant pas toujours ainsi. Lorsque le plasma de peptone coagule rapidement, sous l'influence d'anhydride carbonique par exemple, il y a alors production d'une grande quantité de thrombine qui neutralise complètement l'antithrombine.

peu de thrombine à la combinaison et se coaguler; mais si le complexe est vieux, le fibrinogène qu'on ajoute ne peut plus le dissocier et ne coagulera pas. Tous ces faits reproduisent fidèlement ce que nous connaissons sur les combinaisons capables de se réaliser entre une toxine, son antitoxine et la cellule pour laquelle la toxine a également de l'affinité. Lorsqu'une toxine s'est fixée sur les cellules pour lesquelles elle a une affinité spécifique (toxine tétanique et cellule nerveuse, ricine et globules rouges), la combinaison est trop stable pour que l'addition subséquente d'antitoxine puisse réparer le mal. Inversement, lorsqu'un complexe toxine-antitoxine s'est stabilisé, les cellules toxophyles qu'on y ajoute ne peuvent plus le dissocier pour fixer la toxine. Toutefois, si le complexe est encore récent, il est des cas où la dissociation peut encore se produire lorsqu'on ajoute, par exemple, ainsi que Madsen l'a constaté, des globules rouges à un mélange neutre et récent de ricine et d'antiricine. On voit alors que les globules rouges peuvent encore fixer de la ricine et remettre de l'antiricine en liberté. Or, chose curieuse, et qui met tout particulièrement en relief l'analogie de ces phénomènes avec ceux de la coagulation du sang, la dissociation des complexes toxine-antitoxine, et c'est notamment le cas pour la toxine tétanique et son anticorps, peut être provoquée par l'addition d'acides ou par la dilution. En somme, qu'il s'agisse d'une toxine ou de thrombine, ces phénomènes sont comparables. Lorsqu'on fait un mélange de toxine (ricine, thrombine) avec son antitoxine (antiricine, antithrombine) en présence d'une troisième substance pour laquelle la toxine possède également de l'affinité (globules rouges, fibrinogène), il se fait entre cette troisième substance et l'antitoxine une lutte d'affinités; il s'établit une concurrence pour la possession de la toxine. Et, selon les quantités relatives des substances en réaction et les conditions de milieu qui règlent le jeu des affinités en favorisant les unes aux dépens des autres, il pourra se produire une infinité de combinaisons variables dans un sens ou dans l'autre. Le résultat de ces réactions sera une intoxication plus ou moins forte ou nulle s'il s'agit de toxine, une coagulation plus ou moins rapide ou, au contraire, le maintien de la fluidité s'il s'agit de thrombine.

RÉSUMÉ

Il existe un certain nombre de substances anticoagulantes qu'on réunit sous le terme général d'*antithrombines* parce qu'elles ont la propriété de neutraliser plus ou moins quantitativement la thrombine. Les deux types principaux de ces substances sont l'extrait des têtes de sangsues ou hirudine et l'antithrombine du plasma de peptone.

1° En vérité, si les antithrombines préservent le sang de la coagulation, ce n'est pas en neutralisant la thrombine qui s'y formerait éventuellement, mais bien plutôt en paralysant la production de cet agent. Nous avons réussi, en effet, à montrer que les antithrombines exercent leur action inhibitrice aux différents temps de la coagulation et d'une façon d'autant plus intense qu'on les fait intervenir plus précocement dans l'évolution du processus. S'il faut, par exemple, toutes choses égales d'ailleurs, une solution d'hirudine au 1/2.500e pour neutraliser une quantité donnée de thrombine, il suffira d'une solution au 1/10.000e pour entraver la réaction sérozyme-cytozyme qui donne naissance à cette même quantité de thrombine, et une solution au 1/200.000e seulement pour inhiber la transformation du prosérozyme en sérozyme actif. Ainsi s'explique pourquoi le plasma de peptone et le plasma hirudiné ne contiennent pas de thrombine.

2° La neutralisation réciproque de la thrombine et de l'antithrombine donne lieu à la formation de complexes qui résistent au vieillissement, mais que le chauffage à 60° désagrège en remettant l'antithrombine en liberté. La combinaison thrombine-antithrombine se prête, d'autre part, à diverses observations fort comparables à celles relatives au mode d'union des antigènes et des anticorps.

Lorsque l'union de la thrombine et de l'antithrombine doit se faire en présence de fibrinogène pour lequel la thrombine a également de l'affinité, il se produit un partage des affinités et la thrombine fait coaguler une plus ou moins grande quantité de fibrinogène, alors qu'elle n'a pas encore complètement neutralisé l'antithrombine.

En somme, il semble bien que l'antithrombine s'oppose à l'action de la thrombine sur le fibrinogène, parce qu'en raison de son affinité pour la thrombine, elle tend à se substituer au fibrinogène.

3° Bien que les résultats précédents s'obtiennent aussi bien avec l'antithrombine de plasma de peptone qu'avec l'hirudine, on ne peut en aucune façon identifier ces deux substances. Il existe de trop grandes différences entre les propriétés du plasma de peptone et celles du plasma hirudiné. Tandis que le premier se coagule par l'addition d'agents thromboplastiques tels que l'eau distillée, les acides, un courant d'anhydride carbonique, etc., le second reste parfaitement indifférent à leurs actions. Certains auteurs (Dastre et Floresco, Mellanby) ont même été jusqu'à nier l'existence de l'antithrombine du plasma de peptone, qu'ils considèrent simplement comme un excès d'alcali déversé par le foie dans la circulation lors du choc propeptonique. Mais je n'ai pu confirmer une telle opinion — par ailleurs déjà fort critiquée — car, même en employant la méthode colorimétrique fort délicate de Mac Mariott, je n'ai pu déceler la moindre différence d'alcalinité entre le plasma de peptone et le plasma normal.

4° Les lipoïdes ont la propriété de faire coaguler le plasma de peptone et le plasma hirudiné. Ce fait, observé pour la première fois par Wooldridge, s'explique de façon totalement différente selon la théorie générale de la coagulation que l'on adopte.

Nos recherches sur cette question nous ont amené à confirmer l'opinion de Bordet et de Delange, selon laquelle les lipoïdes (cytozyme) s'uniraient, en présence de calcium, avec le sérozyme pour donner de la thrombine et entreraient donc dans la constitution même de cet agent. C'est, par conséquent, en tant que générateurs de thrombine que les lipoïdes font coaguler le plasma de peptone et le plasma hirudiné.

Nous ne pouvons nous rallier à la façon de voir de Nolf, selon laquelle les lipoïdes seraient de simples agents thromboplastiques et feraient coaguler le plasma de peptone de la même manière que l'eau distillée, l'anhydride carbonique ou les précipités colloïdaux. La similitude des effets exercés par les lipoïdes et par les agents thromboplastiques ne donne que l'illusion d'une similitude d'action. Rappelons, en effet, que les

lipoïdes ajoutés à du sérum riche en sérozyme y font naître, à l'égal des leucocytes, des plaquettes ou des sucs de tissus, une grande quantité de thrombine nouvelle, ce qu'aucun agent thromboplastique ne peut réaliser. Nous avons pu démontrer de plus que les agents thromboplastiques, facteurs favorisants de la coagulation, ne peuvent agir qu'au prorata de la teneur du plasma en lipoïdes cytozymiques, facteurs déterminants du phénomène.

Nous ne pouvons pas non plus accepter l'opinion de Howell, d'après laquelle les lipoïdes neutraliseraient l'antithrombine en raison d'une soi-disant affinité chimique existant entre ces deux substances.

Jamais, en effet, nous n'avons pu observer la neutralisation, ni même l'atténuation de l'antithrombine par les lipoïdes seuls, mais seulement par l'action combinée des lipoïdes et du sérozyme, ce qui nous confirme dans l'opinion que c'est, au contraire, en satisfaisant son affinité pour le sérozyme que le cytozyme lipoïdique triomphe de la résistance de l'antithrombine.

Au cours de nos recherches, nous avons pu encore observer un certain nombre de faits particuliers :

5° L'antithrombine du plasma de peptone est partiellement adsorbable par de grandes quantités de phosphate tricalcique.

6° L'antithrombine du plasma de peptone est fortement atténuée par un courant d'anhydride carbonique; il ne s'agit pas d'une altération de l'antithrombine, car celle-ci récupère son activité dès qu'on chasse l'anhydride carbonique par un courant d'air.

7° La thrombine obtenue par la macération de fibrine dans une solution salée hypertonique (thrombine de Gamgee et thrombine de Howell) n'est pas pure. Elle contient du cytozime.

8° La thrombine peut agir en milieu décalcifié, mais elle perd néanmoins beaucoup de son activité quand on l'oxalate.

Je ne puis terminer ce mémoire sans exprimer ici ma vive gratitude à M. le professeur Bordet qui, au cours de mes recherches, n'a cessé de me prodiguer ses conseils éclairés et ses encouragements.

L'ISOLEMENT DES BACILLES DE KOCH A PARTIR DES CRACHATS TUBERCULEUX D'APRÈS LA MÉTHODE DE PÉTROF

par Henri LIMOUSIN.

En 1915, S. A. Pétrof, chef du laboratoire de recherches du sanatorium Trudeau, à Saranac Lake (New-York), a publié dans le *Johns Hopkins Hospital Bulletin* une méthode très pratique pour isoler les bacilles de Koch des crachats tuberculeux par ensemencement sur milieu d'isolement, sans passer par l'animal.

Au cours d'un récent voyage aux Etats-Unis, nous avons eu l'heureuse occasion de travailler au laboratoire du sanatorium Trudeau où Pétrof a bien voulu nous montrer sa technique. Nous avons tout récemment étudié et appliqué celle-ci au laboratoire de M. le professeur Calmette à l'Institut Pasteur, et nous croyons être utile aux bactériologistes en la décrivant.

Nous avons opéré sur des crachats recueillis à l'hôpital Laënnec, dans le service du professeur Léon Bernard. Le principe de la méthode consiste d'abord à traiter les crachats, à l'étuve à 37°, par une solution de soude caustique pour les liquéfier et tuer la plus grande partie des germes, le bacille de Koch n'étant pas détruit par l'alcali; puis à ensemencer le culot de centrifugation de ce mélange sur un milieu spécial : œuf, peptone et violet de gentiane (cette matière colorante a pour but d'empêcher le développement des germes, autres que le bacille de Koch, qui n'auraient pas été détruits par la soude).

Technique.

Les crachats sont recueillis dans un flacon stérile à large goulot, pourvu d'un bon bouchon de caoutchouc. Pour les crachats fluides, peu purulents, on emploie parties égales de crachat et de solution stérile de NaOH (à l'alcool) à 4 p. 100 dans l'eau distillée. Si les crachats sont épais, très purulents, on

augmente la proportion de solution de soude jusqu'à trois et quatre fois le volume du crachat. On agite vigoureusement et on porte à l'étuve à 37° pendant trente minutes. On agite à nouveau et on reporte encore trente minutes à l'étuve. On centrifuge pendant un quart d'heure, puis on enlève le liquide surnageant de façon à n'en laisser que deux ou trois gouttes au-dessus du culot. Si l'opération a été bien conduite, le sédiment ne doit pas avoir de consistance glaireuse et doit être exempt de grumeaux. On ajoute quatre à cinq gouttes d'HCl à 4 p. 100. On vérifie la réaction acide au tournesol et on aspire à la pipette le sédiment émulsionné par agitation dans le liquide surnageant. Il ne reste plus qu'à ensemencer celui-ci sur cinq tubes du milieu spécial coloré, en versant à la surface de chaque tube trois à quatre gouttes de l'émulsion. On recherche par la même occasion la présence de bacilles de Koch dans le crachat en déposant une goutte de l'émulsion sur une lame lavée préalablement à l'acide chlorhydrique. Cette dernière manœuvre a pour but de faire adhérer à la lame le sédiment qui se fixe très mal sur le verre ordinaire. On colore ensuite par la technique de Ziehl-Nielsen.

Préparation du milieu de Pétrof.

Prendre 250 grammes de veau frais écrasé au hachoir stérile;
Ajouter 212 grammes d'eau distillée,
Et 37 gr. 5 de glycérine stérile.

Placer le tout à la glacière pendant une nuit, puis filtrer sur gaze stérile.

Prendre d'autre part des œufs frais (16 à 20), désinfecter la coquille par immersion quinze minutes dans l'alcool à 70°. Les casser en les manipulant avec des gants de caoutchouc stérilisés.

Mélanger intimement blanc et jaune, puis filtrer sur gaze stérile.

Mélanger : 200 cent. cubes de filtrat de viande avec
400 cent. cubes de filtrat d'œuf.

Ajouter, pour 100 cent. cubes de ce mélange, 1 cent. cube de la solution suivante :

Violet de gentiane.	0 gr. 5
Alcool à 95°	50 cent. cubes.

Bien mélanger, puis répartir en tubes.

Coaguler, comme pour le sérum, à l'étuve à :

85°	pendant	30	minutes	le premier jour;
75°	—	30	—	le deuxième jour;
75°	—	30	—	le troisième jour.

Les ustensiles employés doivent tous être stériles.

Le milieu obtenu présente une belle coloration violette homogène qui permet d'observer facilement l'apparition des colonies qui poussent au jaune.

Pétrof utilise ce même milieu sans violet pour les repiquages ultérieurs après isolement des bacilles.

Résultats.

Tous les échantillons de crachats contenant des bacilles de Koch après le traitement à la soude nous ont donné d'emblée une culture pure de bacilles tuberculeux. Il arrive que, dans quelques tubes, on observe les premiers jours de rares colonies d'impuretés qui ne parviennent pas à envahir le milieu. Il s'agit presque toujours d'un coccus rouge brique ou d'un leptothrix (obtenu une seule fois) qui liquéfie totalement le milieu.

Il est essentiel de n'ensemencer qu'un sédiment bien débarrassé de mucus. En pratique, cette méthode nous a toujours permis d'obtenir au moins deux tubes de culture de bacille de Koch pur sur cinq ensemencés.

Lorsque le sédiment est très riche en bacilles, ceux-ci poussent en douze à quatorze jours, formant un voile presque continu, farineux, sec, recouvrant toute la surface où a coulé l'émulsion. Lorsque le sédiment est très pauvre, la culture pousse beaucoup plus lentement; les colonies apparaissent alors isolées, peu nombreuses et très petites.

(Laboratoire de M. le professeur Calmette.)

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921 Septembre — N° 9.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921.	France	45 fr.
— — — —	Union Postale.	55 fr.
Prix du numéro, — —		4 fr.

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément 28 francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément:
Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 9

Pa

35e ANNÉE SEPTEMBRE 1921 N° 9

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU BACILLE TUBERCULEUX BILIÉ

par A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE.

Depuis les publications déjà anciennes — la première date de 1908 — de l'un de nous en collaboration avec C. Guérin (1), on sait que le bacille tuberculeux d'origine bovine, cultivé en séries successives sur pommes de terre cuites dans de la bile de bœuf glycérinée à 5 p. 100, perd graduellement son pouvoir tuberculigène et acquiert des propriétés biologiques particulières qui permettent de l'utiliser pour conférer aux jeunes bovins une résistance manifeste aux infections virulentes, naturelles ou provoquées, et que cette résistance se maintient aussi longtemps que les animaux traités conservent dans leurs organes lymphatiques des bacilles atténués vivants. La résistance cesse dès que les bacilles-vaccins ont été éliminés par les voies naturelles d'excrétion.

Nous nous sommes proposés — et c'est ce qui fait l'objet du présent mémoire — d'observer les effets de ce bacille bilié sur l'organisme de divers animaux, autres que ceux de l'espèce bovine, sensibles à l'infection tuberculeuse. Notre étude a été

(1) *Acad. des Sciences*, 28 décembre 1908, 2 novembre 1909 et ces *Annales*, septembre 1911, février 1913, avril 1914, février 1919 et septembre 1920.

poursuivie parallèlement sur des animaux neufs et sur des animaux préalablement infectés de bacilles virulents.

Nos expériences ont été effectuées avec des cultures du 200e au 235e passage sur milieu bilié, réensemencées toutes les deux semaines et maintenues à la température de 38°.

Nous n'avons constaté aucune modification dans les caractères de notre bacille. Reporté sur pommes de terre-bouillon glycériné ordinaire, sa culture reprend l'aspect normal du bacille tuberculeux sur ce milieu, mais il ne récupère aucune virulence et il reste incapable de produire des tubercules.

I. — Effets d'une seule inoculation de bacilles biliés aux animaux sains.

a) COBAYE. — Les faibles doses de 0 milligr. 5 à 1 milligramme (nos chiffres correspondent toujours au poids de bacilles pesés à l'état frais), injectées en une seule fois *sous la peau*, ne produisent ni abcès ni réaction ganglionnaire ; seulement un peu de tuméfaction locale qui se condense en un petit noyau dur, lequel disparaît en deux ou trois semaines, sans laisser de traces.

Avec 5 à 10 milligrammes on voit apparaître très rapidement un œdème auquel succède un petit abcès qui, du dixième au douzième jour, s'ouvre à l'extérieur, forme un véritable chancre à bords taillés à pic et qui suppure pendant deux à quatre semaines, puis se cicatrise. Le ganglion correspondant présente une légère tuméfaction, bientôt effacée.

L'infection ne se généralise pas. L'animal reste en parfaite santé.

Dans le péritoine, les petites doses sont également bien supportées. A partir de 3 à 5 milligrammes on observe une réaction épiploïque et mésentérique intense, avec formation de petits amas d'apparence nodulaire, pédiculés, constitués au centre par une agglomération de bacilles et de polynucléaires, à la périphérie par des cellules macrophages noyées dans un réseau de cellules conjonctives. Ces nodules, plus ou moins conglomérés, finissent par se résorber. Chez les animaux sacrifiés trois mois après l'inoculation, et qui sont d'ailleurs restés en parfait état de santé apparente, on ne les retrouva plus.

L'inoculation de 1 milligramme *en plein derme du coussinet plantaire* est intéressante. Elle détermine un œdème sensible qui persiste deux ou trois jours et qui s'efface presque complètement. Puis, du dixième au douzième jour, on voit tout à coup la face palmaire se tuméfier de nouveau. Il s'y forme plusieurs petits ulcères superficiels, d'apparence lupique. Le ganglion poplité correspondant devient volumineux; il peut atteindre les dimensions d'un pois. La région inguinale s'empâte. Les ulcères laissent suinter une sérosité sanguinolente qui contient quelques bacilles granuleux, altérés, presque tous intraleucocytaires.

Au bout de quelques jours, la tuméfaction ganglionnaire disparaît, la lésion locale se couvre d'une croûte épaisse, puis se cicatrise, ne laissant d'autre trace qu'un peu d'épaississement du derme.

Plus intéressante encore est l'*inoculation intravasculaire* réalisée par *ponction du cœur.*

Les doses de 1 à 10 milligrammes, injectées en une seule fois sous le volume de 1/2 cent. cube pour les jeunes cobayes de 150 à 200 grammes, de 1 cent. cube pour les cobayes adultes, sont parfaitement tolérées.

Les premiers jours qui suivent, on n'observe rien d'anormal. Puis tout à coup, vers le quinzième jour, apparaît une brusque tuméfaction de tout le système ganglionnaire, principalement apparente aux aînes, et qui persiste pendant une dizaine de jours, puis s'efface définitivement. Les animaux sacrifiés au cours de cette période réactionnelle ne présentent aucune altération viscérale; tous leurs organes sont apparemment sains. On ne trouve aucun tubercule dans les poumons, ni dans la rate, bien que les bacilles soient nombreux dans celle-ci, et dans la moelle osseuse.

On peut injecter impunément 25, 50 et même 100 milligrammes (toujours sous le volume de 1 cent. cube) dans le cœur des cobayes adultes sans produire de lésion tuberculeuse. A l'examen histologique des organes des animaux sacrifiés vingt jours après l'inoculation, on trouve seulement des bacilles dans tous les organes, généralement inclus dans des macrophages volumineux.

L'*introduction dans l'estomac*, au moyen d'une petite sonde

œsophagienne, de 50 à 100 milligrammes de bacilles provoque également, après deux ou trois semaines, une tuméfaction passagère de tout le système ganglionnaire et surtout des ganglions mésentériques. Il n'en résulte d'ailleurs aucun dommage pour la santé des animaux qui restent parfaitement sains.

Enfin, comme l'un de nous, avec C. Guérin et V. Grysez (1), avait montré avec quelle facilité les bacilles tuberculeux virulents traversent la muqueuse oculaire sans y laisser la moindre trace de leur passage et vont créer, dans les ganglions cervicaux correspondants, d'énormes lésions qui rappellent celles de la scrofule humaine, puis se généralisent, nous avons répété les mêmes expériences d'*infection par instillation* de bacilles biliés en émulsion concentrée (100 milligrammes par cent. cube).

Ces bacilles sont absorbés comme les bacilles virulents. Ils provoquent dans les ganglions cervicaux une tuméfaction fugace; mais, après quelques semaines, on ne les retrouve plus et l'engorgement ganglionnaire s'est complètement effacé.

*
* *

b) Lapin. — L'*injection sous-cutanée* de petites doses de bacilles biliés (1 à 5 milligrammes) est aussi bien supportée par le lapin que par le cobaye, mais la sensibilité de cet animal aux inoculations intraveineuses est manifestement plus grande. A partir de 20 milligrammes on provoque assez fréquemment la formation de foyers de pneumonie dont la masse hépatisée est bourrée de bacilles. Les animaux succombent alors après deux ou trois semaines. Mais nous avons cependant pu faire supporter à plusieurs lapins jusqu'à 100 milligrammes sans que leur santé soit troublée.

*
* *

c) Chien. — Un petit chien, pesant environ 4 kilogrammes, a reçu une première fois dans les veines 0 milligr. 5 de bacilles biliés; cinq jours après, une nouvelle dose de 1 milligramme,

(1) *Soc. de Biol.*, 15 février 1913.

également dans les veines, et trois mois plus tard 10 milligrammes dans le péritoine.

Sauf un peu d'hyperthermie après la deuxième et la troisième injection, il est resté en parfait état.

Nous l'avons sacrifié au bout de six mois. Son autopsie n'a fait découvrir qu'un petit groupe de ganglions mésentériques assez volumineux, noyés dans une masse graisseuse. Ces ganglions ne contenaient d'ailleurs aucun foyer caséeux. Leur structure était normale, mais ils contenaient encore des bacilles intacts.

*
* *

d) Singe. — Un macaque *cynomolgus*, inoculé une première fois le 24 septembre 1920, *dans le péritoine*, avec 2 milligr. de bacilles biliés, et une seconde fois le 16 janvier 1921, avec 4 milligrammes, également dans le péritoine, est resté parfaitement gai et bien portant pendant deux mois. Le 25 mars 1921, ayant contracté une infection intestinale au contact d'un autre singe, il mourut. Les organes, soigneusement examinés, ne présentaient aucune lésion tuberculeuse.

*
* *

e) Cheval. — Alors que les bacilles biliés de 42e passage s'étaient encore montrés virulents et tuberculigènes pour un cheval, dans une expérience relatée par l'un de nous avec C. Guérin en 1911 (1), nous avons constaté que ceux de 213e passage, à la dose de 10 milligrammes *intraveineuse*, produisent une fièvre passagère (température maxima 39°5) à partir du deuxième jour après l'inoculation. Cette fièvre dure dix jours, sans troubles fonctionnels autres qu'un peu d'accélération des mouvements respiratoires et d'amaigrissement, puis tout rentre dans l'ordre.

Un cheval neuf a reçu 100 milligrammes de bacilles biliés dans la veine jugulaire en une seule injection. Chez lui, la température s'est élevée à 40°4 à partir du quatrième jour. Elle a

(1) Ces *Annales*, 9 septembre 1911.

diminué ensuite pour se maintenir entre 39°5 et 40° pendant deux semaines qui furent suivies d'une série d'oscillations thermiques décroissantes jusqu'au trentième jour. Pendant toute cette période fébrile l'animal avait peu d'appétit, sa respiration et son pouls étaient accélérés, ses muqueuses subictériques, sa démarche chancelante. Il présentait des œdèmes fugaces aux membres et l'auscultation, du septième au quinzième jour, faisait percevoir des signes de congestion pulmonaire. Six semaines après l'inoculation l'animal était parfaitement rétabli.

Cinq mois après, nous lui avons injecté de nouveau, dans la jugulaire, 200 milligrammes de bacilles biliés, dilués dans 500 cent. cubes d'eau physiologique. L'injection fut poussée très lentement et bien supportée.

Ce cheval fut sacrifié deux semaines plus tard. On trouvait des bacilles dans tous ses viscères et dans ses ganglions lymphatiques, mais aucun de ses organes ne présentait la moindre lésion tuberculeuse.

Le cheval offre donc une sensibilité plus grande au bacille bilié que les petits animaux de laboratoire. L'infection massive, intraveineuse, détermine chez lui une maladie fébrile, d'allure typhique, assez bénigne et qui ne s'accompagne d'aucune formation nodulaire.

II. — Effets des inoculations répétées de bacilles biliés aux animaux sains.

On sait que les inoculations répétées de bacilles virulents, vivants ou morts, lorsqu'elles sont faites par voie sous-cutanée par exemple, à des intervalles convenables, déterminent une hypersensibilité de plus en plus grande qui se manifeste par un effort de l'organisme tendant à l'expulsion de plus en plus rapide des bacilles (*phénomène de Koch*).

Il était intéressant d'observer ce qui se passe dans les mêmes conditions vis-à-vis des bacilles biliés.

Quatre cobayes qui avaient reçu une première fois 0 milligr. 5 de bacilles biliés sous la peau ont été soumis à une nouvelle injection de la même dose, également sous la peau, vingt-six jours plus tard. Cette seconde injection a déterminé chez tous

l'apparition rapide (en quelques heures) d'un œdème volumineux, dur, puis d'un abcès fluctuant, atteignant le sixième jour le volume d'un pois, qui s'est résorbé dans la suite sans s'ulcérer.

Avec de plus fortes doses, dépassant 1 milligramme, une seconde injection, faite vingt-six jours après la première, détermine toujours la formation d'un abcès qui se vide à l'extérieur, suppure en s'ulcérant et guérit en quatre à cinq semaines.

Les réinfections par voie vasculaire (ponction du cœur) de 1 à 2 milligrammes, lorsqu'elles sont faites moins de trente jours après la première, n'entraînent généralement aucun accident. Mais lorsqu'on les effectue plus tardivement, par exemple après soixante ou soixante-quinze jours, la moitié des animaux succombent très vite, en six à quarante-huit heures, en hypothermie, comme il arrive chez les cobayes tuberculeux intoxiqués par une forte dose de tuberculine; et pourtant, à l'autopsie, on ne trouve aucune lésion tuberculeuse.

Les mêmes phénomènes s'observent, avec plus d'intensité encore, chez les lapins.

Mais c'est chez le cheval qu'il est le plus facile de les étudier.

Les réinoculations intraveineuses produisent des réactions thermiques de plus en plus précoces et de plus en plus brèves, comme si la substance toxique, pyrétogène des microbes était libérée avec une vitesse croissante au cours des injections successives.

C'est ainsi que, chez un cheval qui a subi, du 8 juillet 1920 au 16 mars 1921, toute la série de réinfections successives aux doses indiquées ci-après, quelles que fussent les doses injectées après la seconde inoculation, l'hyperthermie apparaissait dès la deuxième heure; elle s'accroissait jusqu'à la dixième ou la douzième, puis décroissait rapidement; mais la température ne redevenait normale qu'après cinq à sept jours.

Il ne s'agit donc pas d'une réaction tuberculinique, mais d'une véritable réaction d'infection, au cours de laquelle nous avons constaté un accroissement progressif du nombre des lymphocytes, des petits mononucléaires et des grands mononucléaires, avec diminution parallèle du nombre des polynucléaires.

Cheval.

8 juillet 1920. . .	Injection intraveineuse de	10 milligr.	bacilles biliés.
11 septembre 1920.	—	5	—
12 octobre —	—	5	—
2 novembre —	—	5	—
16 — —	—	10	—
11 décembre —	—	10	—
13 janvier 1921. . .	—	15	—
15 février — . .	—	10	—
7 mars — . .	—	1	—
Tous les jours, du 8 au 16 mars	—	1	—

Cet animal, mort d'embolie vasculaire le 10 mai, à la suite de l'injection massive intraveineuse de 300 milligrammes, ne présentait à l'autopsie aucune lésion tuberculeuse. Tous ses organes étaient sains.

III. — Effets des bacilles biliés sur les animaux tuberculeux.

Au cours de nos nombreuses expériences nous avons constaté que les animaux *sains*, inoculés soit avec des bacilles biliés vivants, soit avec des bacilles biliés tués par la chaleur, deviennent, après des temps variables suivant la dose de bacilles reçue par eux, sensibles à la tuberculine.

Un lapin, par exemple, injecté par voie intraveineuse avec 20 milligrammes de bacilles biliés morts, présente le vingt et unième jour une réaction tuberculinique typique après une injection sous-cutanée de 0 c. c. 1 de tuberculine brute.

Il n'est donc pas surprenant que, lorsqu'on injecte des bacilles biliés aux animaux déjà infectés par des bacilles virulents, on provoque non seulement le phénomène de Koch, mais aussi une élévation de température. Toutefois celle-ci est plus tardive et plus prolongée que celle que l'on observe après les injections de tuberculine.

L'introduction de bacilles biliés, même à fortes doses plusieurs fois répétées, dans l'organisme des animaux déjà tuberculisés ne produit aucune aggravation de la maladie.

Une vache qui réagissait positivement à la tuberculine a ainsi reçu, dans la jugulaire, une première fois 10 milligrammes de bacilles biliés. 36 heures après, sa température, qui était

jusque-là normale, s'est élevée à 40° 2 et s'est maintenue les jours suivants entre 38° 6 et 39° 6.

Neuf jours plus tard, nous lui avons injecté en une seule fois, également dans la veine, 50 milligrammes de bacilles biliés. Sa température, qui était encore de 38°8 lors de l'injection, s'est élevée à 40° 6 à la quarante-huitième heure et a mis douze jours à redescendre à la normale. Cette vache présenta tout d'abord quelques symptômes alarmants : forte dyspnée, toux brève, fréquente, marche pénible, amaigrissement progressif pendant trois semaines. Elle se rétablit ensuite, reprit son poids et son appétit normaux. Nous l'avons sacrifiée au bout de deux mois et demi. On lui trouva deux petits abcès pulmonaires caséeux et de nombreux tubercules calcifiés dans le ganglion médiastinal postérieur. C'étaient des lésions manifestement anciennes. Aucun de ses organes ne présentait de formations tuberculeuses récentes.

Le pus des lésions pulmonaires a tuberculisé un cobaye. Ces lésions n'étaient donc pas dues au bacille bilié.

IV. — Résistance conférée au cobaye par le bacille bilié aux infections par le bacille tuberculeux virulent.

Nous avons entrepris des expériences en vue de rechercher s'il est possible, au moyen du bacille bilié, introduit dans l'organisme à dose unique ou à doses plusieurs fois répétées, de conférer au cobaye une résistance appréciable à l'infection expérimentale par le bacille virulent.

Jusqu'à présent, les résultats que nous avons obtenus montrent que l'imprégnation par voie sanguine et *par une seule injection intracardiaque* paraît être, dans une certaine mesure, efficace, tandis que les inoculations préventives à petites doses par voie sous-cutanée ou par voie péritonéale, ne le sont pas, au moins vis-à-vis des infections virulentes graves.

L'épreuve de nos animaux a toujours été faite par la méthode instituée par l'un de nous avec C. Guérin, et qui consiste à instiller sur l'un des yeux une goutte d'émulsion concentrée de culture virulente (10 milligrammes de bacilles bovins, de virulence connue, triturés au mortier d'agate avec 1 goutte de bile de bœuf et 1 cent. cube d'eau salée physiologique). Aucun

animal ne résiste à ce mode d'infection qui offre l'avantage de ne créer aucune lésion de porte d'entrée et d'évoluer avec assez de lenteur. Les ganglions du cou sont d'abord atteints. Au bout de quatre à cinq semaines ils sont nettement perceptibles au toucher, ont déjà le volume d'un pois, et la maladie se généralise par voie descendante en deux mois et demi à trois mois, suivant une marche des plus régulières.

Nous avons traité préventivement un lot de cobayes par une seule injection intracardiaque de 1 à 5 milligrammes de bacilles biliés. Quelques-uns de ces animaux ont été éprouvés comme il est dit ci-dessus, un mois plus tard, en même temps qu'un nombre égal de témoins qui tous, ont succombé avec de volumineux ganglions du cou, caséifiés, et des lésions tuberculeuses multiples, principalement dans les poumons et la rate.

Les cobayes traités préventivement restent en parfait état de santé apparente trois mois et demi après qu'ils ont subi l'épreuve d'infection virulente.

Ceux que nous avons sacrifiés à la fin du deuxième et du troisième mois n'ont aucune lésion pulmonaire ni viscérale. On trouve chez tous un ou deux ganglions cervicaux gros comme une lentille ou un petit pois, très différents d'aspect de ceux des témoins. Alors que, chez ces derniers, les ganglions sont énormes, pleins de pus caséeux fourmillant de bacilles, les ganglions des traités ont une consistance dure et sont constitués par une coque fibreuse contenant, au lieu de pus, un liquide séreux, clair, pauvre en leucocytes et ne montrant que de rares bacilles.

Nos observations doivent être poursuivies beaucoup plus longtemps en vue d'établir si la résistance ainsi conférée est durable. Mais *il apparaît évident que l'infection tuberculeuse évolue d'une manière toute différente chez les cobayes préventivement traités par l'injection intracardiaque de bacilles biliés que chez les témoins.*

C'est la seule conclusion que, quant à présent, nous soyons fondés à retenir.

SUR L'EMPLOI DE L'ACIDE OXYAMINOPHÉNYLARSINIQUE ET DES ACIDES ARYLARSINIQUES EN GÉNÉRAL DANS LE TRAITEMENT DES SPIRILLOSES ET DES TRYPANOSOMIASES

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

par E. FOURNEAU.

A la suite de ses recherches et de celles de ses collaborateurs Ehrlich a été amené à conclure à la spécificité de l'arsenic trivalent (forme arsénoïque : — As = As —; forme oxyde d'arsine: — AsO) et à rejeter l'emploi des acides arsiniques, dont le type le plus connu est, on le sait, l'arsanilate de sodium ou Atoxyl.

Cependant, quand on lit avec soin les travaux d'Ehrlich et en particulier la célèbre étude qu'il a faite en collaboration avec Hata (1), on a l'impression que sa doctrine repose sur des bases fragiles. Ces bases sont les suivantes :

1° Les acides arsiniques (à l'état de sels neutres) n'ont pas d'action sur les parasites *in vitro*; ce n'est donc pas sous cette forme qu'ils les détruisent quand on les injecte à des animaux infestés. D'autre part, les dérivés à arsenic trivalent (arsénoïques-oxydes d'arsine) étant très actifs *in vitro*, il est naturel de penser que les acides arsiniques sont réduits dans l'organisme et Ehrlich fut ainsi amené logiquement, semble-t-il, à traiter les maladies ressortissant de la médication arsenicale, directement par les dérivés aromatiques où l'arsenic est trivalent.

2° Même en admettant pour tout acide arsinique et pour

(1) Ehrlich et Hata. *La Chimiothérapie expérimentale des spirilloses* (traduction Emery). A. Maloine, éditeur, Paris, 1911.

l'arsénoïque correspondant une activité égale, c'est-à-dire un rapport $\frac{C}{T}$ (C = action curative, T = dose tolérée) identique, une raison majeure oblige, dit Ehrlich, à écarter les acides arsiniques. Tous ceux qui ont été essayés jusqu'ici, même l'Atoxyl, malgré qu'ils ne soient pas très toxiques à proprement parler, ont donné lieu à des troubles nerveux se traduisant, chez l'homme par de l'amaurose (Atoxyl), chez les animaux, par des mouvements convulsifs et des phénomènes giratoires (souris danseuses). Or on n'observe pas ces accidents après l'administration des dérivés arsénoïques.

Contre les conclusions qu'Ehrlich a tirées de ces observations, conclusions qui ont orienté toutes ses recherches et celles qui ont été faites après lui jusqu'à ces dernières années, je puis apporter les arguments suivants :

1° L'action *in vitro* ne détermine pas nécessairement l'action *in vivo*. Exemple : Bleu de méthylène (Ehrlich et Hata, *loc. cit.*, p. 13). D'ailleurs, *in vivo*, c'est surtout le rapport $\frac{C}{T}$ qui compte, et la plupart des antiseptiques, qui sont si puissants dans une culture, n'agissent pas chez l'animal infecté.

2° Les arsénoïques ne sont pas toujours actifs *in vitro*. C'est le cas pour l'arsénophénylglycine. Il semble que des facteurs inconnus, d'autres fonctions que la fonction arsénoïque, interviennent dans un sens favorable ou défavorable à l'action antiseptique.

3° Les arsénoïques ne sont pas toujours plus actifs *in vivo* que les acides dont ils dérivent. C'est le cas pour l'acide oxyaminophénylarsinique, comparé au 606 par Ehrlich lui-même.

« Le rapport $\frac{C}{T}$ pour cet acide est en effet le même qu'avec le « dioxydiaminoarsénobenzol (606) ». (Ehrlich Hata, p. 44); du moins dans le seul cas où la comparaison a été faite. Parfois même les acides sont plus actifs; c'est le cas pour l'acide dichlorophénolarsinique comparé à l'arsénoïque correspondant (Ehrlich Hata, p. 20).

4° *Il n'est pas démontré que les accidents nerveux sont imputables à la seule fonction acide arsinique.*

Mes recherches déjà anciennes sur l'Atoxyl et la découverte que j'ai faite de fortes proportions d'arsénite de soude dans des échantillons, d'origine allemande, de ce produit (1), mais surtout les travaux entrepris récemment à l'Institut Rockefeller (2) et ceux effectués dans mon laboratoire m'induisent à penser que les accidents nerveux signalés par Ehrlich sont dus, peut-être, à des impuretés de l'Atoxyl et des acides arsiniques employés par Hata. S'il en était bien ainsi, le principal argument contre l'emploi des acides arsiniques tomberait, et les recherches sur les arsenicaux prendraient une tout autre direction, l'emploi en clinique des acides offrant de grands avantages sur celui des arsénoïques.

Examinons d'abord le cas de l'Atoxyl.

Les troubles oculaires ont été surtout signalés au début de l'emploi de ce médicament contre l'avarie, alors que non seulement on en administrait de très fortes doses, mais encore à un moment où, comme je viens de le dire, il contenait des proportions notables d'arsénite de soude. On peut donc penser que cette impureté de l'arsanilate de soude était pour quelque chose dans les cas d'amaurose, d'ailleurs rares, qui ont été signalés.

Passons à l'acide oxyaminophénylarsinique. Voici ce qu'en dit Hata, qui ne l'a expérimenté que dans la fièvre récurrente (Ehrlich Hata, *loc. cit.*, p. 44).

« L'acide oxyaminophénylarsinique est notablement moins toxique que le composé précédent (oxyde aminophénolarsinieux) *le rapport* $\frac{C}{T}$ *est à peu près le même qu'avec le dioxydiaminoarsénobenzol* (*606*). Mais ce composé provoque les mêmes accidents secondaires (souris danseuses) que l'acide dichlorophénolarsinique et *ne peut, pour ce motif*, entrer dans la pratique. »

Il m'a semblé qu'on ne pouvait, sans de nouveaux essais, condamner des produits possédant des qualités sérieuses.

Même à s'en tenir au seul cas de l'acide oxyaminophénylarsinique qui s'est montré aussi actif que n'importe quel autre

(1) Voir à ce sujet les premières communications de M. Hallopeau sur le traitement de l'avarie par l'atoxyl.

(2) Jacob et Heidelberger.

composé arsenical dans le traitement de la fièvre récurrente, il était intéressant de l'étudier dans d'autres maladies.

J'ai donc fait préparer dans mon laboratoire et étudier sur les animaux un certain nombre d'acides arsiniques. Les recherches purement chimiques seront publiées à une autre place (1). Mais je dirai tout de suite que les essais effectués sur les animaux ont montré la supériorité incontestable de l'acide oxyaminophénylarsinique sur les autres acides. Aussi les recherches ont-elles convergé momentanément autour de ce composé. La préparation très délicate de cet acide et celle de son sel de soude ont été étudiées avec grand soin par M. Tréfouel, qui les a obtenus parfaitement blancs et purs. Nous avons noté l'extrême altérabilité du sel de sodium en solution aqueuse (cette dernière noircissant en quelques minutes quand on l'abandonne à l'air) et nous avons établi les conditions d'emploi de ce sel que nous désignerons ci-après par le chiffre 189.

Le 189 a été étudié par M. Navarro dans le laboratoire de M. Mesnil (trypanosomiases) dans celui de M. Levaditi (spirilloses, syphilis expérimentale) et dans le mien (toxicité, influence de l'oxydation, etc).

M. Navarro a pu constater l'action curative manifeste du 189 dans ces diverses maladies. Dans aucun cas, sauf après l'injection des doses limites, il n'a été observé d'accidents nerveux chez les animaux. Par contre, des solutions anciennes, plus ou moins colorées par suite d'oxydation à l'air, se sont montrées nettement plus toxiques que les solutions fraîchement préparées.

Dès que ces constatations eurent été établies d'après les expériences sur un grand nombre d'animaux, j'ai remis le 189 au Dr Fournier qui a bien voulu se charger des essais sur la syphilis humaine dans son service de l'hôpital Cochin et qui en publiera le résultat.

(1) Elles ont été exécutées par mon collaborateur, M. le professeur Madinaceitia à Madrid, et par MM. Tréfouel et Puyal, et ont porté surtout sur l'acide oxyaminophénylarsinique et ses dérivés, sur l'acide diméthylaminobenzylarsinique, etc.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA FABRICATION DES NITRATES PAR L'OXYDATION BIOCHIMIQUE DE L'AMMONIAQUE

(PREMIER MÉMOIRE)

par E. BOULLANGER.

Le point de départ de ces recherches a été le travail de Müntz et Lainé sur la nitrification intensive et l'établissement de nitrières à hauts rendements (1).

Ces deux expérimentateurs avaient conclu de leurs études :

1° Que la tourbe constitue un excellent milieu pour la nitrification bactérienne ;

2° Qu'en utilisant la tourbe pour l'établissement de nitrières à déversement continu de liquide ammoniacal, on pouvait nitrifier par jour et par mètre cube de tourbe 1.000 litres de solution de sulfate d'ammoniaque à 7 gr. 5 par litre et obtenir, en outre, des solutions à 5 ou 6 p. 100 de nitrate de chaux en établissant une série de nitrières semblables et en faisant passer de l'une à l'autre les liquides nitrifiés de la nitrière précédente, additionnés après chaque passage d'une nouvelle dose de sulfate d'ammoniaque correspondant à 7 gr. 5 de ce sel par litre de liquide.

Si ces résultats obtenus au laboratoire, pendant un temps très court et sur de simples cloches, étaient applicables en grand et d'une façon continue, on pouvait envisager la fabrication, par cette méthode, de grosses quantités d'acide nitrique qui atteindraient, d'après les chiffres donnés ci-dessus, environ 90 tonnes de nitrate de chaux par hectare et par jour.

Sur le conseil et sous la direction de MM. Pottevin, Girard et Schlœsing, des recherches ont été faites en 1917 et 1918 pour élucider cette question, qui pouvait présenter, à cette époque, un intérêt considérable. Le programme de ces recher-

(1) *Annales de la Science agronomique*, 3e série, 2, 1906.

ches a été le suivant : 1° compléter au laboratoire les études de Müntz et Lainé par la détermination de certains facteurs importants du travail pratique : conditions de mise en marche des nitrières, volume maximum des affusions en marche continue et prolongée, nature du sel ammoniacal à employer pour la mise en route et l'alimentation des nitrières, concentration maxima des solutions de nitrates qu'on peut obtenir par cette méthode, rendement de la transformation dans les conditions pratiques, nature du support à adopter pour les ferments nitrificateurs; 2° construire une installation semi-industrielle pour y étudier les possibilités de réalisation pratique des résultats obtenus au laboratoire par Müntz et Lainé et par nos études complémentaires.

Nous résumerons, dans ce premier mémoire, les résultats de nos recherches de laboratoire.

Ces études ont été faites à l'étuve à 28°, dans des cloches en verre de 4 litres remplies soit de tourbe concassée, soit d'autres supports bactériens, et arrosées régulièrement à la main avec une solution de sulfate d'ammoniaque. Ces cloches étaient, au préalable, ensemencées avec des cultures actives de ferments nitrificateurs, obtenues aisément sur scories baignant partiellement dans 100 cent. cubes de milieu ammoniacal d'Omelianski (1), additionné de délayure de terre.

1° Conditions de mise en marche des nitrières et volume maximum des affusions journalières.

Des cloches ainsi préparées et ensemencées ont été arrosées avec une solution renfermant, pour un litre d'eau, 2 gr. 5 de sulfate d'ammoniaque et 5 grammes de carbonate de chaux en suspension. Les arrosages ont eu lieu trois fois par jour, le matin, à midi et le soir.

En commençant avec des arrosages correspondant à 200 litres de cette solution par mètre cube de tourbe et par jour, nous avons constaté que l'effluent qui s'écoulait des cloches renfermait toujours de fortes quantités de sel ammoniacal non nitrifié, même après deux mois de fonctionnement; la nitri-

(1) *Archives des Sciences biologiques de Saint-Pétersbourg*, 7, 1899, p. 291.

fication ne s'est établie qu'après vingt jours d'arrosages, et la formation de nitrites n'a été abondante qu'au bout d'un mois ; la formation de nitrates ne s'est manifestée qu'après six semaines, et quand l'expérience a été interrompue, après une durée de plus de deux mois, le liquide qui s'écoulait des cloches renfermait de petites quantités de nitrates, beaucoup de nitrites et beaucoup de sel ammoniacal restant.

Les fortes affusions, employées au début, sont donc nettement défavorables. La nitrification est longue à s'établir, et quand elle se manifeste, la plus grande partie de l'azote oxydé passe à l'état de nitrites. Les nitrates n'apparaissent que beaucoup plus tard et ils restent accompagnés de fortes proportions de nitrites; enfin, l'ammoniaque n'est jamais entièrement oxydée. Ces constatations sont bien d'accord avec les résultats obtenus par Boullanger et Massol (1), qui ont signalé l'influence paralysante qu'exerce l'ammoniaque vis-à-vis du ferment nitrique.

Il faut donc commencer par de très faibles affusions au début, de manière à permettre le peuplement du support en ferments nitriques, à côté des ferments nitreux. L'expérience suivante confirme ce fait. Une cloche a reçu des arrosages journaliers, avec une solution à 2 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, à raison de 60 litres par mètre cube de tourbe et par jour, au lieu de 200 litres. Huit jours après la mise en marche, le liquide qui s'écoulait de la cloche ne renfermait presque plus d'ammoniaque; les nitrites n'ont apparu que pendant quelques jours et ont disparu complètement au bout de quinze jours, les nitrates ont augmenté progressivement et après quinze jours, le fonctionnement de la cloche est resté régulier; le liquide écoulé ne renfermait que des traces d'ammoniaque, pas de nitrites et la formation de nitrates était très forte.

En réduisant sur une autre cloche les arrosages à 30 litres par mètre cube de tourbe et par jour, nous n'avons plus observé que des traces de nitrites : dès le début, l'ammoniaque a été presque complètement oxydée avec formation exclusive de nitrates.

Il faut donc mettre en marche les nitrières avec des affusions très faibles (30 litres de solution à 2 gr. 5 par litre de sulfate

(1) Ces *Annales*, 1904, p. 181.

d'ammoniaque, par mètre cube de tourbe et par jour). Ces affusions peuvent alors être augmentées peu à peu, au fur et à mesure que l'on constate la disparition à peu près complète de l'ammoniaque dans le liquide écoulé. Dans ces conditions, si l'expérience est bien conduite, il n'y a pas de nitrites dans le liquide. Quand on a atteint, avec la solution à 2 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, une affusion correspondant à 150 litres par mètre cube de tourbe et par jour, on commence des arrosages avec une solution de 5 grammes par litre, tenant en suspension 10 grammes par litre de carbonate de chaux, en réduisant l'affusion à 60 litres par mètre cube de tourbe et par jour. On augmente alors progressivement les affusions de cette solution, en se guidant sur la disparition de l'ammoniaque et des nitrites dans le liquide écoulé, et quand on atteint 150 litres par mètre cube de tourbe et par jour, on utilise pour les arrosages la solution à 7 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque tenant en suspension 15 grammes par litre de carbonate de chaux, préconisée par Müntz et Lainé, à raison de 60 litres par mètre cube de tourbe et par jour.

Les expériences de Müntz et Lainé et les nôtres ont montré qu'il n'y a aucun avantage à élever la concentration en sel ammoniacal au delà de ce chiffre, car la nitrification devient moins active.

Les cloches ainsi mises en nitrification ont alors été arrosées avec des affusions croissantes de cette solution à 7 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, à partir de 100 litres par mètre cube de tourbe et par jour. On a maintenu le volume de chaque affusion constant pendant au moins une semaine, en suivant par l'analyse la marche de la nitrière, pour avoir nettement l'influence de la quantité déversée par jour. Voici un exemple de mise en marche d'une nitrière en cloche au laboratoire :

1° *Solution à 2 gr. 5 de sulfate d'ammoniaque par litre :*

	AFFUSIONS							
	30 lit. au m. c.		60 lit. au m. c.		100 lit. au m. c.		150 lit. au m. c.	
Réactions	15 fév.	26 fév.	28 fév.	2 mars	4 mars	5 mars	6 mars	8 mars
Ammoniaque. .	+	*f*	+	*f*	*f*	*f*	*f*	+
Nitrites	0	*f*	0	0	0	0	0	0
Nitrates	0	++	++	++	++	++	++	++

Réactions : 0, nulle ; *f*, faible ; +, sensible ; ++, forte.

2° *Solution à 5 gr. par litre de sulfate d'ammoniaque :*

	AFFUSIONS						
	60 litres au m. c.			100 l. au m. c.		150 l. au m. c.	
Mars :	9	12	14	15	17	18	19
Azote nitrique formé, en gr. par litre	0,361	0,488	0,828	»	0,912	»	0,940
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre	0,064	0,052	0,054	0,063	0,088	0,101	0,125

3° *Solution à 7 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque :*

a) Affusions de 100 litres au mètre cube :

	20 mars	23 mars	26 mars	30 mars	3 avril
Azote nitrique formé, en gr, par litre.	»	1,060	1,183	1,227	1,473
Azote ammoniacal restant, en gr. par l.	0,146	»	0,197	0,160	0,164

b) Affusions de 150 litres au mètre cube :

	4 avril	5 avril	6 avril	11 avril
Azote nitrique formé, en grammes par litre. .	1,319	1,296	1,245	1,389
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre. .	0,237	0,236	0,233	0,204

c) Affusions de 200 litres au mètre cube :

	12 avril	14 avril	16 avril	18 avril
Azote nitrique formé, en grammes par litre. .	»	1,266	1,288	1,262
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre . .	0,180	0,127	0,131	0,172

On voit que cette affusion de 200 litres au mètre cube est bien supportée, au moins pendant une semaine, mais le rendement en produit transformé semble s'abaisser : la somme de l'azote nitrique formé et de l'azote ammoniacal restant est déjà sensiblement plus faible qu'avec l'affusion à 150 litres. Ce fait s'accentue encore quand on porte l'affusion journalière à 300 litres par mètre cube.

d) Affusions de 300 litres au mètre cube :

	21 avril	23 avril	25 avril
Azote nitrique formé, en grammes par litre	0,960	0,993	0,988
Azote ammoniacal restant, en grammes par litre. . .	0,334	0,386	0,427

Avec cette affusion de 300 litres, on observe déjà, au bout d'une semaine de marche, une formation assez abondante de *nitrites*, et on laisse près de 25 p. 100 de l'azote ammoniacal non nitrifié. Müntz et Lainé avaient constaté une nitrification presque complète avec une affusion de 220 litres par mètre cube et par jour avec la même solution. Ils avaient ensuite pratiqué brusquement, *mais seulement pendant dix heures*

consécutives, des arrosages correspondant à 1.440 litres au mètre cube et ils avaient ainsi obtenu une formation de 1 gr. 014 d'azote nitrique par litre, sur 1 gr. 580 d'azote ammoniacal à transformer. Dans un second essai de *quatorze heures de durée effectué cinq jours après* avec la même affusion, ils n'avaient plus obtenu que 0 gr. 764 d'azote nitrique par litre, sur 1 gr. 580 d'azote ammoniacal à transformer.

Les résultats que nous avons obtenus et signalés plus haut avec l'affusion journalière de 300 litres de solution à 7 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque par mètre cube de tourbe, montrent déjà qu'avec cette affusion on laisse une forte quantité d'azote ammoniacal non nitrifié et que cette quantité augmente de plus en plus au fur et à mesure qu'on prolonge l'expérience. *A fortiori*, des affusions supérieures ne pourraient être maintenues en *marche continue et prolongée*, comme nous avons pu nous en rendre compte par des expériences directes et comme les expériences elles-mêmes de Müntz et Lainé, poursuivies seulement pendant un temps extrêmement court, le laissaient déjà prévoir.

Il importe en outre de remarquer que ces résultats sont établis avec une simple solution de sulfate d'ammoniaque à 7 gr. 5 par litre. Avec des solutions déjà chargées de 4 à 5 p. 100 de nitrate de chaux, telles qu'on les obtient par des repassages successifs des liquides sur les nitrières, après une nouvelle addition de sel ammoniacal à nitrifier, les affusions même réduites à 200 litres par mètre cube de tourbe et par jour ne peuvent pas être maintenues, ainsi qu'il résulte de l'expérience suivante, dans laquelle le liquide d'arrosage renfermait 1 gr. 5 d'azote ammoniacal à transformer par litre et 1 gr. 5 d'azote nitrique préformé, avec 15 grammes de carbonate de chaux par litre.

a) Affusions de 150 litres au mètre cube, du 25 avril au 2 mai :

	27 avril	2 mai
Azote nitrique formé, en grammes par litre	2,408	2,636
Azote ammoniacal restant, en grammes par litre	0,274	0,242

b) Affusions de 200 litres au mètre cube du 2 au 9 mai :

	4 mai	7 mai	9 mai
Azote nitrique formé, en grammes par litre	2,625	2,290	2,209
Azote ammoniacal restant, en grammes par litre	0,241	0,463	0,570

L'élévation très rapide du taux d'azote ammoniacal non transformé a forcé à réduire l'affusion à 100 litres au mètre cube.

c) Affusions de 100 litres au mètre cube, du 9 au 15 mai :

	11 mai	14 mai
Azote nitrique formé, en grammes par litre	2,582	2,414
Azote ammoniacal restant, en grammes par litre.	0,256	0,273

On voit donc qu'une quantité relativement faible de nitrate préformé ralentit déjà le phénomène ; les affusions ont dû être réduites à 100 litres par mètre cube de tourbe et par jour avec une solution d'arrosage renfermant seulement 1 gr. 5 d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre.

Il était nécessaire de se rendre compte de l'action des concentrations plus élevées en nitrates sur la marche de la nitrification, car l'application industrielle ne serait évidemment possible que si on peut produire des solutions très concentrées de nitrates, susceptibles d'être évaporées sans dépenses exagérées de charbon. L'expérience précédente a donc été reprise avec l'affusion journalière correspondant à 100 litres par mètre cube de tourbe, et avec un liquide progressivement enrichi en nitrate de chaux par repasses successives sur la nitrière, après nouvelle addition de sel ammoniacal et de craie, de manière à avoir toujours dans ce liquide 1 gr. 5 par litre d'azote ammoniacal à transformer, avec une charge croissante de nitrate de chaux. Les résultats obtenus ont été les suivants :

	2 avril	11 avril	16 avril	18 avril	20 avril
Azote nitrique formé, en gr. par litre.	1,412	2,398	3,072	3,292	3,574
Azote ammoniacal restant, en gr. par lit.	0,223	0,206	0,136	0,187	0,225

	23 avril	30 avril	2 mai	4 mai	7 mai
Azote nitrique formé, en gr. par litre.	4,094	5,450	5,763	5,901	6,644
Azote ammoniacal restant, en gr. par lit.	0,256	0,227	0,373	0,467	0,711

	9 mai	21 mai	23 mai	25 mai
Azote nitrique formé, en grammes par litre. .	7,024	8,386	8,786	9,020
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre . .	0,754	0,914	0,998	0,911

Comme à cette période la quantité d'azote ammoniacal non nitrifié atteignait près des deux tiers de la quantité introduite, l'affusion de 100 litres par mètre cube de tourbe et par jour a été réduite à 75 litres. L'azote ammoniacal restant a alors

diminué peu à peu pour atteindre le 29 juin 0 gr. 641 par litre (ce qui est encore élevé) avec une richesse en azote nitrique de 11 gr. 006 par litre, correspondant à 64 gr. 46 de nitrate de chaux. Cette affusion de 75 litres par mètre cube de tourbe et par jour paraît être l'affusion maxima qu'on puisse employer quand le liquide renferme déjà 64 grammes par litre de nitrate de chaux, puisqu'elle laisse plus de 40 p. 100 de l'azote ammoniacal non transformé. Pour obtenir la transformation de 85 à 90 p. 100 de l'azote ammoniacal dans un liquide déjà chargé d'environ 60 grammes de nitrate de chaux par litre, il est même probable que l'affusion journalière devrait être réduite à 50 litres par mètre cube de tourbe.

Si le taux de nitrate de chaux est plus faible et si on le maintient aux environs de 40 grammes par litre, l'affusion journalière peut être augmentée et atteindre 100 litres par mètre cube de tourbe, comme le montre l'expérience suivante. Une cloche en nitrification, ayant atteint le titre de 50 grammes de nitrate de chaux par litre, laissait, avec une affusion journalière correspondant à 100 litres au mètre cube, 0 gr. 836 d'azote ammoniacal restant par litre, sur 1 gr. 500 introduits. Le titre du liquide d'arrosage a alors été ramené uniformément chaque jour à 6 grammes d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, avec 15 grammes de carbonate de chaux en suspension. Avec une affusion journalière maintenue à 100 litres par mètre cube de tourbe, nous avons obtenu les résultats suivants :

	25 juin	29 juin	3 juill.	7 juill.
Azote nitrique formé, en grammes, par litre..	8,440	7,531	6,410	6,450
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre. .	0,836	0,950	0,961	0,811

	11 juill.	19 juill.	27 juill.	29 juill.
Azote nitrique formé, en grammes par litre. .	6,951	7,016	7,009	7,070
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre. . .	0,520	0,424	0,316	0.283

Au 29 juillet, la marche de la cloche était ainsi redevenue normale. On a alors essayé de relever l'affusion journalière à 200 litres par mètre cube de tourbe. Huit jours après, le liquide écoulé renfermait déjà 0 gr. 757 d'azote ammoniacal restant par litre, soit plus de 50 p. 100 de la quantité introduite, et la marche de la cloche a dû être interrompue.

Ces essais permettent de penser qu'en marche industrielle continue et prolongée, avec des solutions renfermant 1 gr. 5 par litre d'azote ammoniacal à transformer et 40 à 45 grammes par litre de nitrate de chaux préformé, l'affusion journalière ne pourrait guère dépasser 75 à 100 litres par mètre cube de tourbe. Avec une charge plus forte de nitrate de chaux préformé, cette affusion devrait même certainement être diminuée. Ces chiffres sont très éloignés de ceux qui ont été indiqués par Müntz et Lainé (1.000 à 1.400 litres au mètre cube), mais ces résultats de Müntz et Lainé, que nous avons d'ailleurs vérifiés, ne sont exacts que dans les conditions où ces savants se sont placés, c'est-à-dire en opérant seulement pendant quelques heures et sur des liquides très dilués et sans aucune surcharge de nitrate de chaux préformé. Or, la marche industrielle doit être forcément continue et prolongée; elle doit aboutir en outre à la production de solutions très concentrées de nitrate de chaux, qu'on puisse évaporer pratiquement sans dépenses exagérées de charbon; dans ces conditions, les résultats sont tout à fait différents de ceux qui avaient été obtenus par Müntz et Lainé dans leurs expériences, et la production des nitrières sera de ce fait très inférieure à celle que ces expériences pouvaient faire prévoir.

2° Nature du sel ammoniacal à employer.

Les expériences qui précèdent montrent que le sulfate d'ammoniaque convient très bien pour la mise en route des nitrières. Le nitrate d'ammoniaque est beaucoup moins favorable, ce qui s'explique aisément par l'action paralysante du nitrate sur la multiplication des microbes nitrificateurs, comme l'ont montré Boullanger et Massol (1). Une cloche de tourbe, mise en route le 13 mars, avec une solution de nitrate d'ammoniaque renfermant par litre 0 gr. 5 d'azote ammoniacal et 0 gr. 5 d'azote nitrique, ne donnait le 6 avril, c'est-à-dire plus de trois semaines après, qu'un liquide renfermant 0 gr. 758 par litre d'azote nitrique, avec 0 gr. 187 d'azote ammoniacal restant, pour un arrosage journalier très réduit de 50 litres par

(1) Ces *Annales*, 1903, p. 510.

mètre cube de tourbe. La marche n'est devenue régulière et normale que le 16 avril.

Les premiers arrosages doivent donc être faits au sulfate d'ammoniaque, pour accoutumer peu à peu les ferments nitrificateurs au nitrate formé et permettre leur multiplication et le peuplement du support.

Pour l'enrichissement successif des solutions, Müntz et Lainé ont recommandé d'additionner les solutions écoulées de la quantité de sulfate d'ammoniaque nécessaire pour ramener le titre en azote ammoniacal à 1 gr. 5 par litre. Par double décomposition avec le nitrate de chaux que renferme déjà la solution, il se précipite du sulfate de chaux qu'on sépare et on utilise ainsi pour l'arrosage un liquide qui est constitué par une solution de nitrate d'ammoniaque et de nitrate de chaux en excès, non décomposé.

Nous avons expérimenté ce procédé, qui a fourni en cloches des résultats satisfaisants. Il présenterait cependant, si on devait le faire passer dans la pratique industrielle, de très gros inconvénients. Le précipité de sulfate de chaux qui se forme est très volumineux, très difficile à séparer et à laver; les solutions d'arrosage sont saturées de ce sel, qui cristallise peu à peu par évaporation et bouche les orifices des appareils; en outre, c'est un résidu gênant et inutilisable, qui exige pour sa manutention une main-d'œuvre considérable. Il faut enfin procéder sans cesse, sur les nitrières, à de nouvelles additions de carbonate de chaux pour remplacer la chaux ainsi éliminée à l'état de sulfate.

Nous avons essayé l'emploi du bicarbonate et du sesquicarbonate d'ammoniaque qui éviteraient tous ces inconvénients. En ajoutant à la solution de nitrate de chaux écoulée une quantité calculée de bicarbonate ou de sesquicarbonate d'ammoniaque, il se précipite du carbonate de chaux et il se forme du nitrate d'ammoniaque en quantité correspondante. La masse entière, y compris le précipité, peut alors être remontée sur la nitrière, sans qu'il y ait aucune perte de calcaire dans cette opération.

Les premiers essais entrepris avec les carbonates d'ammoniaque ont porté sur des solutions renfermant respectivement 9 gr. 3, 18 gr. 6, 27 gr. 9, 37 gr. 2, 46 gr. 5, 55 gr. 8,

65 gr. 1, et 74 gr. 4 de nitrate de chaux préformé par litre. Ces liquides ont été additionnés de la quantité de bicarbonate ou de sesquicarbonate d'ammoniaque suffisante pour obtenir après double décomposition un liquide renfermant 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre. L'addition de carbonate d'ammoniaque entraîne la formation immédiate d'un précipité de carbonate de chaux qui se dépose facilement, très tassé et très fin : en même temps, il se dégage de l'acide carbonique. L'alcalinité du carbonate d'ammoniaque disparaît aussitôt. Tous ces liquides ont été successivement passés sur de la tourbe ensemencée en ferments nitrificateurs, en commençant par les plus pauvres en nitrates. Ils ont parfaitement nitrifié jusqu'à la dose de 55 gr. 8 de nitrate de chaux préformé par litre ; il y a eu ensuite un ralentissement notable de la nitrification pour les concentrations supérieures.

Ces expériences montrent qu'on peut parfaitement utiliser, pour les doubles décompositions destinées à introduire de nouveau de l'ammoniaque dans les solutions écoulées, le bicarbonate ou le sesquicarbonate d'ammoniaque, qui présentent sur le sulfate d'ammoniaque des avantages considérables.

Nous avons également reconnu que pendant la concentration des solutions en nitrate de chaux par repasse des liquides écoulés, après addition de sel ammoniacal, on peut sans inconvénients recourir au nitrate d'ammoniaque cristallisé, au lieu d'utiliser le nitrate d'ammoniaque de double décomposition par action du sulfate ou du carbonate d'ammoniaque sur le nitrate de chaux préformé. Le seul point important est de commencer la mise en marche avec le sulfate d'ammoniaque et de ne recourir au nitrate d'ammoniaque que quand les ferments nitrificateurs sont bien développés et la nitrification en pleine marche.

3° Concentration maxima des solutions de nitrate de chaux produites.

Dans leurs études, Müntz et Lainé ont préconisé la méthode suivante pour l'enrichissement des solutions en nitrate de chaux qui s'écoulent des nitrières. On dispose une série de nitrières, au nombre de huit par exemple. La première est

alimentée avec une solution à 7 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, tenant en suspension le carbonate de chaux nécessaire. Le liquide qui s'en écoule est additionné de la quantité suffisante de sulfate d'ammoniaque pour ramener son titre à 7 gr. 5 par litre de ce sel. Le sulfate de chaux qui se précipite est séparé et la solution obtenue, additionnée de carbonate de chaux, sert à alimenter la seconde nitrière. Le liquide qui s'en écoule est traité comme le précédent : après addition d'une nouvelle dose de sel ammoniacal, séparation du sulfate de chaux et addition de carbonate de chaux, on utilise le liquide pour l'alimentation de la troisième nitrière. On opère ainsi, de proche en proche, jusqu'à la huitième. Müntz et Lainé ont obtenu par cette méthode, sur la huitième nitrière, des solutions renfermant 47 gr. 27 de nitrate de chaux par litre.

Cette méthode peut convenir pour des essais de laboratoire, mais elle paraît difficilement applicable en industrie. Elle forcerait à avoir autant de pompes, de bacs et d'ateliers de séparation de sulfate de chaux qu'il y a de nitrières, tous les liquides étant à des concentrations variables. Le contrôle chimique serait long et compliqué et si un accident quelconque survenait à l'une des nitrières, la marche de tout le système se trouverait compromise par l'arrêt d'un des échelons intermédiaires. Enfin, il y aurait des discontinuités fréquentes dans le fonctionnement par suite des huit passages de liquides qu'il faudrait effectuer en même temps de nitrière à nitrière.

Nous avons donc cherché une autre méthode. Tout d'abord, pour l'enrichissement du liquide en nitrate, nous avons fait repasser, *sur la même cloche nitrière*, le liquide écoulé, additionné chaque fois d'une nouvelle dose de sel ammoniacal, au lieu d'employer une série de huit cloches successives dont chacune recevait le liquide écoulé de la précédente et additionné d'une nouvelle dose de sel ammoniacal. Cette méthode avait déjà été expérimentée par Müntz et Lainé dans leurs études : elle leur avait donné des résultats moins réguliers que les passages sur des nitrières successives, mais cependant satisfaisants, puisqu'ils étaient arrivés à obtenir ainsi des solutions renfermant 58 grammes de nitrate de chaux par litre. Nous avons vu plus haut, dans nos essais relatifs au volume maximum des affusions journalières, que cette méthode de

repasse des liquides sur la même cloche nous a donné des résultats tout à fait satisfaisants, puisque nous avons pu obtenir en sept semaines des solutions renfermant 52 gr. 82 de nitrate de chaux par litre, avec un enrichissement parfaitement régulier. Nous verrons plus loin que cette concentration peut être très notablement dépassée. On ne voit d'ailleurs pas la raison pour laquelle ce procédé pourrait fournir des résultats différents de l'autre puisque, dans la méthode de Müntz et Lainé, la dernière nitrière subit en somme, dans sa mise en route, un traitement identique à celui que nous faisons subir à notre nitrière unique, avec cette seule différence que c'est le liquide provenant de l'avant-dernière nitrière qui y passe, au lieu d'être son propre liquide. Il n'y a donc aucun inconvénient à adopter ce mode de travail et les nitrières successives ne sont pas nécessaires pour arriver à l'enrichissement maximum.

Nous avons fait un assez grand nombre d'expériences pour déterminer la concentration maxima en nitrates qu'on peut obtenir par cette méthode. Dans une première série d'essais, en employant comme sel ammoniacal le sulfate d'ammoniaque, avec séparation du sulfate de chaux précipité et addition de craie pulvérisée, nous n'avons pas pu dépasser le titre de 11 gr. 141 d'azote nitrique par litre, correspondant à 65 gr. 25 de nitrate de chaux anhydre : au delà de cette concentration, la nitrification ne se produisait plus et il y avait déjà un ralentissement sensible du phénomène pour les doses supérieures à 45 grammes de nitrate de chaux par litre. Ces chiffres sont d'accord avec ceux qui ont été donnés par Müntz et Lainé. Ces savants ont bien observé des teneurs de 100 à 200 grammes de nitrate de chaux par litre, mais dans des terres arables ou du terreau, maintenues dans des conditions physiques très spéciales et subissant une nitrification très lente par rapport à celle qui est envisagée dans les nitrières à déversement. Mais pour les essais effectués dans les conditions de marche normale de ces nitrières, le chiffre le plus élevé signalé par Müntz et Lainé a été de 58 grammes de nitrate de chaux par litre, ce qui correspond bien à nos chiffres donnés ci-dessus.

En réalité, cette concentration peut être très notablement

dépassée si on a soin de remplacer en temps voulu le sulfate d'ammoniaque par le carbonate d'ammoniaque, ce qui élimine l'influence gênante du sulfate de chaux et donne un carbonate de chaux précipité, très divisé et très facilement attaquable. Nous avons mis en route, le 23 décembre, de grandes cloches de 23 litres, remplies soit de tourbe, soit d'un autre support dont nous parlerons plus loin, la pouzzolane. Ces cloches ont d'abord été alimentées pendant 22 jours avec une solution à 2 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, pour permettre le peuplement microbien. Elles n'ont reçu ensuite que du sesquicarbonate d'ammoniaque que l'on ajoutait dans la solution de nitrate de chaux écoulée, de manière à avoir une solution renfermant 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, qu'on remontait sur la cloche pour les arrosages. Tout le carbonate de chaux ainsi précipité par double décomposition entre le nitrate de chaux préformé et le sel ammoniacal était également remonté sur la nitrière avec la solution. Dans ces conditions, tout le nitrate de chaux obtenu a été formé par les microbes; le titre en azote nitrique s'est élevé très lentement, mais avec une régularité parfaite, pour atteindre, au bout de six mois de marche, *23 gr. 6 par litre, ce qui correspond à une teneur en nitrate de chaux anhydre de 138 gr. 2 par litre*. Les affusions journalières avaient été maintenues, pendant tout cet enrichissement de la nitrière, à 70 litres par mètre cube de support, nos expériences antérieures ayant montré qu'il n'est pas possible pratiquement de dépasser ce volume dans une marche continue et prolongée. Dans ces conditions, même avec une surcharge de près de 130 grammes de nitrate de chaux préformé par litre, la nitrification de 1 gr. 5 d'azote ammoniacal introduit par litre était presque complète, puisque le liquide écoulé ne renfermait plus que 0 gr. 1 à 0 gr. 15 d'azote ammoniacal non transformé.

On peut donc conclure de ce qui précède qu'il est possible d'obtenir, dans les conditions spéciales de marche que nous avons indiquées pour les nitrières à déversement, des solutions de nitrate de chaux assez concentrées pour qu'on puisse les évaporer industriellement par effets multiples, sans dépenses exagérées de combustible.

Dans ces conditions, nous avons cherché à appliquer aux

nitrières la marche pratique du travail de la vinaigrerie. On sait que, dans cette industrie, une partie du vinaigre écoulé est reprise pour être additionnée de la quantité d'alcool suffisante pour avoir un liquide qui titre par exemple 5° acétiques et 3° d'alcool. Le passage de ce liquide sur les acétificateurs donne un vinaigre à 8° acétiques. Une partie du liquide écoulé constitue la production ; l'autre partie est reprise pour former le liquide d'arrosage, par une nouvelle addition d'alcool. On n'a ainsi qu'un seul liquide d'arrosage et tous les appareils marchent au même titre. On conçoit sans peine la simplification énorme de travail industriel qu'entraîne ce procédé par rapport à la méthode, indiquée par Müntz et Lainé, dans laquelle la dernière nitrière seule fournit toute la production, les autres constituant les degrés successifs d'enrichissement de la solution.

Des cloches de tourbe ont été mises ainsi en nitrification et enrichies ensuite en nitrates par repasses successives de leurs liquides écoulés, additionnés d'une nouvelle dose de sel ammoniacal (1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre). Quand le titre en azote nitrique a atteint 7 gr. 5 d'azote nitrique par litre, soit environ 44 grammes de nitrate de chaux, les cloches ont été soumises au régime suivant : on recueillait tous les matins le liquide écoulé provenant d'un volume V déversé sur chaque cloche dans les vingt-quatre heures précédentes. Ce volume correspondait à une affusion de 100 litres par mètre cube de tourbe et par jour, on déterminait aussitôt le titre a de ce liquide en azote ammoniacal restant par litre et son titre b en azote nitrique formé par litre. On reconstituait alors un nouveau volume de liquide d'arrosage égal à V, mais titrant 6 gr. d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, en prenant un volume v de la solution écoulée et en l'additionnant d'eau et de la quantité d d'azote ammoniacal nécessaire, sous la forme de nitrate d'ammoniaque. Remarquons qu'en introduisant cette quantité d d'azote ammoniacal, on introduisait également une quantité d d'azote nitrique provenant du nitrate d'ammoniaque. Les valeurs de v et de d se déterminaient alors aisément par la résolution des deux équations suivantes :

$$V \times 6 = vb + d$$
$$V \times 1{,}5 = va + d.$$

On mesure le volume *v* ainsi déterminé, on y ajoute la quantité *d* d'azote ammoniacal sous forme de nitrate d'ammoniaque et on ramène au volume V avec de l'eau, on a ainsi reconstitué le volume V d'arrosage journalier. Après le prélèvement du volume *v*, il reste une certaine quantité de liquide écoulé : une partie calculée de cette solution, traitée par le carbonate d'ammoniaque, donne le nitrate d'ammoniaque en quantité correspondante à la quantité *d* d'azote ammoniacal à introduire. Le reste constitue la production journalière de nitrate de chaux. On peut d'ailleurs effectuer la double décomposition avec le carbonate d'ammoniaque sur toute la fraction du liquide écoulé qui reste après prélèvement du volume *v*. On obtient ainsi un liquide ne renfermant plus que du nitrate d'ammoniaque et du carbonate de chaux. Tout le carbonate de chaux ainsi précipité est renvoyé à la nitrière avec le volume de liquide correspondant à la quantité *d* d'azote ammoniacal à introduire. On évite ainsi toute introduction nouvelle de calcaire, qui est sans cesse régénéré. Le reste du liquide constitue la production journalière de nitrate d'ammoniaque de la nitrière.

Cette marche, d'application industrielle facile, a été poursuivie en cloches pendant plusieurs semaines sans la moindre difficulté. On peut d'ailleurs, pour simplifier le travail, prendre pour le volume V la quantité de liquide qui correspond à une semaine d'arrosages. Dans ces conditions, l'opération décrite ci-dessus se fait seulement tous les sept jours sur les liquides écoulés de la nitrière pendant la semaine.

Voici un exemple de ce mode de travail. Une cloche de quatre litres de tourbe, en pleine nitrification et enrichie jusqu'à ce que les liquides écoulés titrent 7 gr. 5 d'azote nitrique par litre, a été arrosée pendant plusieurs semaines, à raison de 400 cent. cubes par jour (soit 100 litres au mètre cube) avec une solution renfermant 6 grammes d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre. Cette solution était obtenue tous les deux jours par prélèvement d'une partie de la solution écoulée et addition d'eau et de nitrate d'ammoniaque, suivant le procédé indiqué plus haut.

Voici les résultats des analyses d'une période de quinze jours, sur le liquide écoulé ramené à son volume primitif

d'arrosage, pour compenser l'évaporation qui fausserait les résultats :

	Juillet				
	19	21	23	27	4 août
Azote nitrique formé, en gr. par litre. . .	7,016	6,933	6,844	7,009	7,070
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre.	0,424	0,412	0,368	0,316	0,283

Nous verrons par la suite que, dans nos expériences semi-industrielles, ce mode de travail, poursuivi pendant plusieurs mois, nous a donné des résultats aussi satisfaisants.

On peut donc conclure de ce qui précède qu'il est possible d'adopter, pour l'oxydation biologique de l'ammoniaque, une méthode de travail pratique analogue à celle de la vinaigrerie, ce qui permet, lorsqu'un enrichissement suffisant en nitrates est atteint, de n'avoir qu'un seul liquide d'arrosage et une seule concentration pour toutes les nitrières.

4° Rendement de la transformation biologique de l'azote ammoniacal en azote nitrique.

Dans leurs expériences, Müntz et Lainé ont signalé que les pertes d'azote pendant la nitrification dans les nitrières à déversement sont très faibles. Nous avons vérifié ce fait qui est bien exact, au moins quand on opère, comme l'ont fait Müntz et Lainé, sur des cloches en pleine nitrification arrosées avec une solution de sulfate d'ammoniaque à 7 gr. 5 par litre. Mais quand on utilise pour l'arrosage des solutions concentrées chargées de nitrate de chaux préformé, le rendement peut être moins satisfaisant. Dans l'expérience que nous venons de décrire, la moyenne des analyses de quinze jours a donné, comme composition du liquide écoulé *ramené à son volume primitif d'arrosage*, les chiffres de 6 gr. 964 d'azote nitrique par litre et de 0 gr. 364 d'azote ammoniacal restant. Le liquide d'arrosage étant à un titre constant de 6 grammes d'azote nitrique et de 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, nous voyons que 1,5 — 0,364, c'est-à-dire 1 gr. 136 d'azote ammoniacal ont donné 6,964 — 6, c'est-à-dire 0 gr. 964 d'azote nitrique, si nous admettons que le nitrate préformé n'est pas attaqué pendant la transformation. *Ces chiffres correspondent*

à un rendement de 84,86 *p.* 100 *à la transformation*, en marche normale continue, avec des solutions à la concentration indiquée ci-dessus.

Les résultats donnés par Müntz et Lainé dans leurs expériences d'enrichissement des solutions de nitrate de chaux par passage sur huit nitrières consécutives (1) montrent que ces pertes se sont manifestées aussi dans leurs essais. En effet, ces cloches recevaient des arrosages journaliers correspondant à 100 litres au mètre cube, qui ne laissent en moyenne que 0 gr. 2 à 0 gr. 3 par litre d'azote ammoniacal non transformé. Or, à chacun des huit passages on ajoutait au liquide écoulé 7 gr. 5 de sulfate d'ammoniaque par litre, ce qui correspond à 1 gr. 59 par litre d'azote ammoniacal. Si la transformation avait eu lieu sans pertes, le liquide sortant de la huitième nitrière aurait dû titrer $1,59 \times 8 = 12$ gr. 72 d'azote nitrique par litre, ou tout au moins 12 gr. 5 en tenant compte de l'ammoniaque restante. Or le chiffre maximum atteint par Müntz et Lainé a été de 9 gr. 951 d'azote nitrique, ce qui correspond sensiblement à un rendement de 80 p. 100.

Pour trancher cette importante question d'une façon plus précise, nous avons mis en route de grandes cloches de 23 litres de tourbe ou de pouzzolane. Après lavage à l'eau, à raison de 210 litres au mètre cube, pendant sept jours pour éliminer les produits acides que renferme la tourbe, nous avons arrosé les cloches, pendant quarante-huit heures, avec de l'eau tenant en suspension de la délayure de tourbe en pleine nitrification, pour les ensemencer. La tourbe et la pouzzolane avaient reçu au préalable une addition de calcaire (environ 40 kilogrammes au mètre cube) et d'un peu de phosphate de chaux. Les affusions de liquide ammoniacal ont commencé le 23 décembre. Chaque cloche recevait le liquide d'arrosage contenu dans un grand flacon dont le volume était exactement de 9 lit. 720. Les liquides écoulés se rassemblaient dans un flacon semblable. Le premier arrosage a été fait avec une solution renfermant 0 gr. 5 d'azote ammoniacal sous forme de sulfate d'ammoniaque et 4 gr. de craie pulvérisée par litre : on procédait à trois arrosages de 270 cent. cubes par jour, ce

(1) Müntz et Lainé, *loc. cit.*, p. 107.

qui correspond à une affusion de 35 litres par mètre cube et par jour. Il a donc fallu douze jours pour épuiser ainsi les 9 lit. 720 de solution. La solution écoulée a alors été reprise, ramenée exactement à 9 lit. 720 et à 0 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre sous forme de sulfate d'ammoniaque, avec addition de 4 grammes de craie par litre. On a fait alors trois arrosages de 540 cent. cubes par jour avec cette solution, ce qui correspond à une affusion de 70 litres par mètre cube et par jour. En six jours, on avait utilisé les 9 lit. 720 de liquide. La solution écoulée a été reprise, ramenée exactement à 9 lit. 720 avec 0 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre sous forme de sulfate d'ammoniaque et 4 grammes de craie par litre. On a fait alors avec cette solution 4 jours d'arrosage à 105 litres par mètre cube et par jour (3 arrosages de 810 cent. cubes par jour). Après passage de ce flacon, le liquide écoulé, ramené à son volume primitif de 9 lit. 720, titrait déjà 0 gr. 593 d'azote nitrique par litre avec la tourbe et 0 gr. 654 avec la pouzzolane : il n'y avait que des traces d'ammoniaque non nitrifiée. On a substitué alors le sesquicarbonate d'ammoniaque au sulfate d'ammoniaque pour l'alimentation des cloches. La solution écoulée, ramenée à 9 lit. 720, a été additionnée de carbonate d'ammoniaque de manière à titrer 0 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre; cette solution a été répandue sur chaque cloche en trois jours, au moyen de 4 arrosages de 810 cent. cubes par jour (soit 140 litres par mètre cube et par jour). La solution écoulée, reprise une cinquième fois et ramenée à 9 lit. 72 avec 0 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre sous forme de carbonate d'ammoniaque, a alors été répandue sur chaque cloche en deux jours, au moyen de 6 arrosages de 810 cent. cubes par jour (soit 210 litres par mètre cube et par jour). Après ces deux jours, soit exactement quatre semaines après la mise en route, le liquide écoulé, ramené à son volume primitif, titrait 1 gr. 110 d'azote nitrique et 0 gr. 046 d'azote ammoniacal restant par litre, pour la cloche de tourbe, et 1 gr. 531 d'azote nitrique et 0 gr. 046 d'azote ammoniacal restant par litre, pour la cloche de pouzzolane. On voit que ce dernier support donne des résultats nettement supérieurs à la tourbe.

La teneur en azote ammoniacal a alors été portée à 1 gramme par litre, toujours au moyen du carbonate d'ammoniaque, et

on a recommencé une série d'arrosages à raison de 105 litres par mètre cube et par jour, pendant huit jours, en ramenant toujours le volume de la solution écoulée à 9 lit. 72 et à 1 gramme d'azote ammoniacal par litre. Après ces passages, le liquide écoulé titrait 1 gr. 803 d'azote nitrique et 0 d'azote ammoniacal restant, pour la tourbe, et 2 gr. 407 et 0 d'azote ammoniacal restant, pour la pouzzolane.

On a porté alors la teneur du liquide d'arrosage en azote ammoniacal à 1 gr. 5 par litre, en utilisant toujours le carbonate d'ammoniaque; l'affusion comprenait trois arrosages de 540 cent. cubes chacun par jour sur chaque cloche (soit 70 litres par mètre cube et par jour). La vidange d'un flacon de 9 lit. 720 durait ainsi six jours. Dès que le flacon était vide, on ramenait aussitôt à 9 lit. 720 le volume écoulé et on portait le titre à 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre avec du sesquicarbonate d'ammoniaque. On ajoutait en même temps de la craie pulvérisée et on recommençait aussitôt une nouvelle série d'arrosages de six jours. L'enrichissement progressif s'est ainsi poursuivi régulièrement pendant sept mois pour la tourbe : à ce moment le liquide écoulé, ramené à son volume primitif de 9 lit. 720, titrait 21 gr. 512 d'azote nitrique par litre, avec 0 gr. 414 d'azote ammoniacal restant, ce qui correspond, comme nous l'avons vu, à une concentration en nitrate de chaux de plus de 12 p. 100. Avec la pouzzolane, l'enrichissement a été beaucoup plus rapide : le titre de 21 grammes d'azote nitrique par litre était atteint au bout de cinq mois et demi et nous avons pu pousser la concentration jusqu'à 23 gr. 625 d'azote nitrique par litre, ce qui correspond à une concentration en nitrate de chaux de près de 14 p. 100.

Les deux cloches de tourbe et de pouzzolane étant ainsi en marche normale et livrant des solutions très concentrées en nitrate de chaux, nous avons cherché à déterminer le rendement à la transformation. Dans ce but, les 9 lit. 720 de liquide d'arrosage ont été amenés au titre de 20 grammes d'azote nitrique et de 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, les arrosages ont été réduits à 53 litres par mètre cube et par jour, et on a poursuivi des arrosages réguliers avec cette solution pendant deux mois et demi, en ramenant chaque fois à 9 lit. 720 et à 20 grammes d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal

par litre la solution écoulée. Les résultats obtenus pendant toute cette période sont réunis dans le tableau suivant :

Cloche de tourbe.

	23 oct.	1er nov.	9 nov.	17 nov.	27 nov.	3 déc.	11 déc.
	—	—	—	—	—	—	—
Azote nitrique formé, en grammes par litre.	21,020	21,130	21,032	20,740	21,050	21,070	21,085
Azote ammoniacal restant, en gr. par litre	0,275	0,285	0,275	0,353	0,387	0,326	0,305

La moyenne de toutes ces analyses donne 21 gr. 018 d'azote nitrique par litre et 0 gr. 315 d'azote ammoniacal restant. On voit donc que 1 gr. 500 — 0 gr. 315 = 1 gr. 185 d'azote ammoniacal ont donné 21 gr. 018 — 20 gr. = 1 gr. 018 d'azote nitrique. Le rendement a donc été de 85,9 p. 100.

Avec la cloche de pouzzolane, les résultats ont été du même ordre. La moyenne des analyses a donné 20 gr. 812 d'azote nitrique et 0 gr. 571 d'azote ammoniacal restant par litre, ce qui correspond à un rendement de 87,4 p. 100.

On peut donc conclure de ces expériences que, dans les conditions d'alimentation et de concentration dans lesquelles nous nous sommes placés, le rendement de la transformation biologique de l'azote ammoniacal en azote nitrique est d'environ 85 à 88 p. 100.

5° Essais de nitrification sur d'autres supports que la tourbe.

L'emploi de la tourbe pour la constitution des nitrières à déversement présente des inconvénients considérables et nous avons pu en apprécier l'importance lors de la mise au point de nos appareils semi-industriels dont nous exposerons les résultats dans un prochain mémoire.

La tourbe est, en effet, un produit très peu homogène, et on extrait fréquemment, dans la même tourbière, des parties dont la nature physique est absolument différente. En outre, il est nécessaire de concasser cette tourbe en morceaux de la grosseur d'un œuf de pigeon. Comme il ne serait pas possible de faire ce concassage à la main pour des nitrières de quelques hectares, on doit laisser sécher la tourbe à l'air pour la concasser ensuite au broyeur, et ce concassage est une opéra-

tion pratique difficile, vu les différences d'état physique : il n'est pas rare d'avoir 60 p. 100 de déchets, pour 40 p. 100 de morceaux utilisables. Le produit, ainsi concassé, est friable, sa manutention en grande masse entraîne l'écrasement des morceaux et la formation d'une quantité énorme de poussier. La circulation sur les lits de tourbe serait impossible à cause de cette friabilité et cette circulation serait cependant nécessaire, sur les nitrières de grande étendue, pour le réglage des répartitions de liquide, l'addition de calcaire et le nettoyage superficiel. On peut bien éviter une partie de ces inconvénients en desséchant artificiellement la tourbe avant de la concasser : on obtient ainsi un produit plus ferme; mais, dans la manutention du produit, l'armature colloïdale de la tourbe en pilettes se trouve détruite et on obtient une tourbe trop compacte, qui ne se laisse plus imprégner et traverser assez facilement par les liquides à nitrifier.

Un autre grave inconvénient est la présence des matières organiques de la tourbe qui se dissolvent peu à peu dans les solutions concentrées de nitrate de chaux et donnent finalement des liquides très rouges, dont la purification est difficile. Ces matières organiques sont fort heureusement peu attaquables par les microbes, car elles constitueraient des aliments pour les ferments dénitrificateurs dont le développement amènerait des pertes importantes en nitrates. Ce fait peut cependant se produire : nous avons observé des pertes de ce genre au début de la mise en route de certaines cloches et aussi, comme nous le verrons, dans nos appareils semi-industriels. Un lavage préalable de la tourbe à l'eau pendant une semaine, avant de commencer les arrosages de liquide ammoniacal, permet de réduire beaucoup ces dangers de pertes, au moins dans la mise en route.

Enfin, nous avons pu nous rendre compte que, dans la marche continue et prolongée, la tourbe se délite peu à peu et occasionne au bout de quelques mois des colmatages qui forcent à interrompre le travail.

Toutes ces constatations montrent que l'emploi de la tourbe serait à peu près impraticable en grande industrie. Nous avons donc été amenés à rechercher d'autres supports. La qualité principale d'un support microbien pour la nitrification est sa

faculté d'imbibition par l'eau. On conçoit aisément que le volume d'affusion journalière possible, et par suite le rendement en nitrate, dépende essentiellement de ce facteur. Une solution ammoniacale qui traverse un lit nitrificateur doit y séjourner le temps matériel nécessaire pour que l'oxydation puisse s'y réaliser à peu près entièrement. Nous avons pu constater, par de nombreuses expériences, qu'avec les liquides renfermant 60 grammes environ de nitrate de chaux préformé et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, le contact doit être d'environ trois jours pour que l'oxydation soit à peu près complète. Si l'affusion donnée est trop forte pour que le liquide déversé sur le lit le traverse en moins de trois jours, l'oxydation de l'ammoniaque reste incomplète. On voit dès lors l'importance de la faculté d'imbibition du support. Si l'on utilise un produit peu poreux qui ne retienne, par exemple, que 50 litres de liquide par mètre cube, on ne pourra pas pratiquement dépasser une affusion journalière de 16 lit. 5 pour que le liquide soit maintenu le temps voulu au contact des ferments. Un arrosage de plus de 50 litres traverserait le lit sans s'arrêter. Si, au contraire, on emploie un produit poreux, dont la faculté d'imbibition est de 300 litres par mètre cube par exemple, on pourra sans inconvénients porter les arrosages à 100 litres par mètre cube et par jour; le déplacement du liquide par capillarité amènera pratiquement au bas du lit, à la fin du troisième jour, le liquide déversé à la surface trois jours auparavant.

Sous le rapport de l'imbibition par l'eau, la tourbe est évidemment un produit très avantageux, bien que sa porosité varie énormément avec sa provenance et avec son traitement. Mais on peut fabriquer des produits dont le pouvoir d'imbibition est bien plus considérable. Avec le concours précieux de M. Larchevêque, manufacturier à Vierzon, nous avons pu préparer des terres poreuses, peu friables, par cuisson d'argile avec des quantités variables de coke ou de sciure de bois. Nous avons obtenu ainsi des produits dont la faculté d'imbibition par l'eau atteignait près de 400 litres au mètre cube, et qui donnaient d'excellents résultats comme supports de ferments nitrificateurs.

Toutefois nous ne devions pas perdre de vue le but indus-

triel de ces études et la solution pratique du problème n'était évidemment pas dans cette voie, si intéressante qu'elle soit, car le prix de revient de fabrication de tels produits, en masses suffisantes pour recouvrir plusieurs hectares, aurait été absolument prohibitif.

Sur le conseil de M. le Dr Louis Martin, nous avons alors expérimenté un autre support, purement minéral, naturel, et très poreux : la pouzzolane des terres volcaniques de la France centrale. On trouve ce produit très abondamment et à très bas prix en Auvergne et en Haute-Loire. MM. Calmette et Rolants l'avaient déjà utilisé en 1908, comme matériau de lits bactériens dans leurs études sur l'épuration biologique des eaux d'égout. Ce sont des scories volcaniques très légères dont le mètre cube pèse 600 à 700 kilogr. sous forme de graviers de la grosseur de noyaux de cerises. Leur porosité n'est pas inférieure à celle de la tourbe : elles retiennent environ 210 litres d'eau par mètre cube dans l'état physique indiqué ci-dessus. Ces scories se trient aisément à la grille, comme les sables, et on peut en avoir des quantités énormes, de toutes dimensions, depuis le sable fin jusqu'aux morceaux de la grosseur de la tête. Ce produit résiste bien à l'écrasement, il se manipule comme le sable avec la plus grande facilité et la rugosité de ses éléments facilite beaucoup, comme pour la tourbe, le maintien du calcaire et des microbes nitrificateurs, que le courant de liquide n'entraîne pas.

Nous avons fait un choix entre divers échantillons de pouzzolanes et nous avons utilisé une pouzzolane de Gravenoire (près de Clermont-Ferrand) et une pouzzolane du Puy (Haute-Loire) en grains de la grosseur de noyaux de cerises. Des cloches de quatre litres, remplies de ces pouzzolanes, ont été mises en nitrification par la méthode indiquée au début de ce mémoire : les résultats ont été remarquables ; la nitrification s'est établie plus rapidement qu'avec la tourbe et avec des affusions journalières correspondant à 200 litres au mètre cube d'une solution à 7 gr. 5 de sulfate d'ammoniaque par litre, prolongées pendant huit jours, le liquide écoulé titrait 1 gr. 006 d'azote nitrique formé et 0 gr. 539 d'azote ammoniacal restant par litre. En ramenant alors l'affusion journalière à 100 litres de la même solution au mètre cube de produit, le liquide écoulé

titrait après quinze jours de marche 1 gr. 513 d'azote nitrique et 0 gr. 070 d'azote ammoniacal par litre.

Nous avons vu, en étudiant plus haut le rendement de la transformation biologique de l'azote ammoniacal en azote nitrique, les résultats très favorables qui ont été obtenus avec les cloches à pouzzolanes.

Il ne semble donc pas que la tourbe exerce sur la nitrification une action spécifique particulière. Des produits purement minéraux, de haute capacité d'imbibition pour les liquides, constituent des supports beaucoup plus pratiques, sur lesquels la nitrification est au moins aussi active.

Conclusions.

Les recherches qui précèdent nous conduisent donc aux conclusions suivantes, qui fixent les conditions dans lesquelles l'application industrielle de la nitrification biologique peut être tentée.

a) Conditions de mise en marche des nitrières et volume maximum des affusions journalières.

Les fortes affusions de 200 litres par mètre cube de tourbe et par jour, employées au début, paralysent le développement du ferment nitrique, qui est gêné par l'excès d'ammoniaque. Il faut donc mettre en route avec des affusions très faibles et ne pas dépasser des affusions de 20 à 40 litres de solution à 2 gr. 5 par litre de sulfate d'ammoniaque, par mètre cube et par jour, afin de permettre le peuplement des lits en ferments nitriques et d'éviter l'oxydation incomplète de l'ammoniaque à l'état de nitrites.

Ces affusions peuvent être augmentées peu à peu, sans dépasser cependant 200 litres par mètre cube de tourbe et par jour pour la solution d'arrosage à 7 gr. 5 de sulfate d'ammoniaque par litre, ne renfermant pas de nitrate de chaux préformé. Les affusions plus fortes (300 litres et au delà) laissent des quantités considérables d'ammoniaque non nitrifiée qui s'élèvent de plus en plus et il n'est pas possible de maintenir cette marche.

Avec les liquides d'arrosage renfermant, à côté de 1 gr. 5 par litre d'azote ammoniacal à oxyder, 40 à 50 grammes de nitrate de chaux préformé, la marche de la nitrification est beaucoup plus lente et les affusions ont du être réduites à un maximum de 75 à 100 litres par mètre cube de tourbe et par jour.

b) Nature du sel ammoniacal a employer.

La présence de nitrates, au début, gêne fortement la multiplication des microbes nitrificateurs. Les premiers arrosages doivent être faits non pas avec une solution de nitrate d'ammoniaque, mais avec une solution de sulfate d'ammoniaque, afin d'accoutumer peu à peu les microbes au nitrate formé et de faciliter leur multiplication.

Quand le peuplement microbien est effectué, on peut utiliser sans inconvénients une solution de nitrate d'ammoniaque provenant soit d'une dissolution de ce sel dans l'eau, ou le liquide nitrifié, soit de la double décomposition par le sulfate ou le carbonate d'ammoniaque de la solution de nitrate de chaux écoulée des nitrières.

La meilleure marche s'obtient avec l'alimentation au moyen de la solution de nitrate d'ammoniaque provenant de la double décomposition par le bicarbonate ou le sesquicarbonate d'ammoniaque de la solution de nitrate de chaux écoulée des nitrières. La double décomposition par les carbonates d'ammoniaque présente en outre de gros avantages dans le travail industriel : suppression du sulfate de chaux, de sa séparation et de sa manutention, régénération du calcaire qui peut être renvoyé sur la nitrière, évaporation plus facile des solutions de nitrate en l'absence de sulfate de chaux en solution, etc.

c) Concentration maxima en nitrates des solutions nitrifiées.

Il n'est pas nécessaire, pour obtenir des solutions concentrées de nitrate de chaux, d'établir une série de 8 ou 9 nitrières semblables et de faire passer les liquides nitrifiés écoulés de l'une sur la nitrière suivante après les avoir additionnés de la quantité de sulfate d'ammoniaque nécessaire pour amener le

titre en azote ammoniacal à 1 gr. 5 par litre et après avoir séparé le sulfate de chaux précipité. On arrive plus simplement à un enrichissement aussi élevé en nitrates en faisant repasser sans cesse sur la même nitrière le liquide écoulé, additionné chaque fois d'une nouvelle dose de nitrate d'ammoniaque.

Les concentrations les plus fortes que nous ayons pu obtenir ont été de 138 gr. 2 de nitrate de chaux par litre, mais ces doses sont celles qui arrêtent peu à peu la nitrification. Nous avons pu au contraire réaliser une oxydation régulière de l'ammoniaque avec une concentration de 120 grammes de nitrate de chaux par litre.

Dans la pratique, on peut avantageusement adopter un mode de travail analogue à celui de la vinaigrerie. Quand les nitrières sont en plein fonctionnement et enrichies en nitrate de chaux de manière à laisser écouler un liquide nitrifié renfermant environ 21 gr. 5 d'azote nitrique par litre (soit sensiblement 12 p. 100 de nitrate de chaux), on reprend une partie de ce liquide nitrifié, l'autre partie constituant la production effective de l'appareil. On additionne la partie reprise d'eau et de carbonate d'aumoniaque de manière à obtenir une solution titrant 20 grammes d'azote nitrique et 1 gr. 5 d'azote ammoniacal par litre, et on la repasse sur la nitrière. Cette solution donne après passage, vu la légère concentration par évaporation, un liquide renfermant environ 21 gr. 5 d'azote nitrique par litre, avec des affusions de 50 à 75 litres par mètre cube de support et par jour. On n'a ainsi qu'un seul liquide d'arrosage et toutes les nitrières marchent au même titre.

d) Essais de nitrification sur divers supports.

L'emploi de la tourbe pour la constitution des nitrières à déversement présenterait des inconvénients considérables pour le travail en grande industrie : manque d'homogénéité de la matière, difficultés pratiques de concassage, friabilité extrême du produit dans la manutention, présence de matières organiques occasionnant au début certaines pertes d'azote par dénitrification et donnant des solutions très colorées de nitrate de chaux, colmatage par suite de la désagrégation progressive des morceaux de tourbe, etc.

La tourbe peut être très avantageusement remplacée par les pouzzolanes, scories volcaniques légères et très poreuses, qu'on peut avoir à bas prix et en très grande abondance en Auvergne et en Velay. Elles donnent d'excellents résultats, supérieurs à ceux que donne la tourbe, comme supports de nitrification, en grains de la grosseur de noyaux de cerises.

Ces conclusions ont servi de base à des études semi industrielles dont nous donnerons les résultats dans un prochain mémoire.

RECHERCHES
SUR LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE

par M. André JOUSSET.

Au cours de mes longues recherches sur la vaccination et la sérothérapie antituberculeuses, j'ai eu l'occasion d'étudier de nombreux échantillons de bacilles. Après beaucoup d'autres, le B. aviaire m'a servi à des essais d'immunisation. La nullité des résultats obtenus, la constatation d'une série de propriétés inédites bien particulières à ce type de microbes m'ont amené peu à peu à mettre en doute le principe de l'unité des germes tuberculeux.

J'ai alors entrepris une série d'expériences de contrôle dont les résultats, s'ils ne tranchent pas définitivement la question, m'ont cependant paru dignes d'être publiés.

I. — Doctrine classique. Unité du bacille tuberculeux.

Dans la discussion entamée par Straus, il y a plus de trente ans, sur l'assimilation ou la séparation des bacilles humains et aviaires, discussion qui, malgré un nombre prodigieux de recherches, n'a pu aboutir à des conclusions définitives, l'acido-résistance et le pouvoir tuberculigène des bacilles ont été les bases de l'argumentation. Pour être classé bacille tuberculeux, il était nécessaire et suffisant qu'un bâtonnet se colorât par le Ziehl et fût capable de produire des tubercules. Que vaut ce critérium?

Dès 1903, j'ai, un des premiers, eu l'occasion de mettre en relief le caractère accessoire et contingent des propriétés tuberculigènes du B. des mammifères et la notion des bacilloses sans follicules est aujourd'hui classique. On sait également que nombre de bacilles tuberculeux perdent, dans des conditions bien déterminées, la propriété fuchsinophile; l'acido-résistance est donc elle-même variable; le meilleur, le plus authentique

des bacilles tuberculeux de l'homme ou du bœuf peut, en somme, être provisoirement dépossédé de la propriété *Ziehl-tubercule* et demeurer un B. de Koch véritable. Cette condition n'est donc pas nécessaire; mais inversement suffit-elle à caractériser un bacille donné? A vrai dire, la question n'a jamais été posée, car si l'on admet sans conteste que les acido-résistants non pathogènes forment un groupe bien tranché et que les microbes tuberculigènes à colorabilité banale se différencient nettement du bacille de Koch, on ne songera guère à opposer l'un à l'autre deux germes à la fois acido-résistants et créateurs de nodules, surtout si les microbes en question présentent certaines analogies culturales, ce qui est le cas pour beaucoup d'échantillons de bacilles aviaires et humains. C'est là une troisième analogie qui explique que, sans plus ample informé, malgré des dissemblances considérables, le bacille des oiseaux ait été, d'emblée et en dépit des protestations de Straus, assimilé au bacille des mammifères et qu'on n'ait pas exigé, comme on doit le faire dans toute détermination d'espèces, cet ensemble imposant d'attributs morphologiques et physiologiques naturels, stables et transmissibles qui doit être à la base de tout travail d'identification. Or, à part les deux ou trois caractères communs précités, ce ne sont entre le B. des mammifères et celui (ou ceux) des oiseaux que différences de forme et de fonction. On peut même dire que la somme de ces différences l'emporte beaucoup sur celle des ressemblances et il s'agirait d'un autre groupe de bactéries pathogènes que le dualisme ne ferait même pas l'objet d'une discussion, car nul ne songerait à assimiler le méningocoque au gonocoque sous prétexte que la forme, la coloration, la végétation et l'aptitude pyogène de ces microbes sont identiques. Que ne fait-on de même avec les divers bacilles de la tuberculose?

Un des partisans les plus chauds de l'unicité des bacilles, S. Arloing, s'est placé sur un autre terrain. Invoquant la « variabilité » extrême du B. tuberculeux, cet auteur fait remarquer que la plupart des dissemblances, relevées entre les B. de l'homme et de l'oiseau, se réduisent à de simples nuances ou qu'elles sont d'un ordre de grandeur tel, qu'elles ne dépassent pas en importance « les variations auxquelles est exposée la généralité des microbes »; il a, en outre, ainsi

que Nocard, pu réaliser expérimentalement la plupart de ces variations. L'argumentation d'Arloing appelle les réflexions suivantes :

a) Les variations invoquées ont un caractère artificiel; ce sont, comme on l'a dit de la plupart de ces mutations brusques, des tours de force de laboratoire, de véritables sports, car ce transformisme ne s'observe jamais spontanément. Il est toujours d'une réalisation difficile et bien des expérimentateurs y ont échoué, en particulier pour l'expérience de Nocard (transformation de l'humaine en aviaire).

b) Les variations ne se transmettent pas héréditairement avec la régularité et la stabilité qui caractérisent l'espèce naturelle.

c) Elles ont l'allure de phénomènes soit d'adaptation, soit de régression ou de dégénérescence, si bien qu'une fois obtenues il devient difficile de remonter la pente et de revenir aux caractères originels. C'est ainsi qu'on n'a jamais réalisé la transformation de l'aviaire en humaine (inverse de l'expérience de Nocard), jamais le retour des cultures homogènes d'Arloing à la culture initiale non homogène, et qu'une fois une tuberculose à caractère abortif obtenue (tuberculose humaine avec lésions Yersin), on n'en a retrouvé le caractère tuberculigène initial.

d) Les modifications obtenues n'ont porté que sur un très petit nombre d'attributs végétatifs, morphologiques et pathogéniques, mais pas sur la totalité des caractères fondamentaux. Les caractères biochimiques, les réactions d'immunité ont été négligés dans le parallèle qu'on a voulu établir. Il existe là une grosse lacune.

Ajoutons enfin que la variabilité n'est pas un caractère spécifique; elle est dans l'ordre physique comme dans l'ordre moral tout le contraire d'un caractère; elle témoigne de la plasticité bien connue des espèces végétales et le raisonnement qui consiste à vouloir confondre deux types botaniques, sous prétexte que leurs limites naturelles sont élastiques, a le grave défaut des argumentations négatives d'où ne saurait surgir aucune conclusion positive. Il est bien certain que le compartimentage n'existe pas dans la nature, mais il faut distinguer la spéculation philosophique des conditions de la pratique et

la délimitation reste une des nécessités de la science. Or Arloing, pour nier le dualisme, se contente de nier la valeur de quelques caractères différentiels, mais outre qu'il ne les réfute pas tous, il ne donne d'autre part aucun argument positif nouveau à l'appui de la doctrine uniciste qu'il suppose établie *a priori* au nom de l'acido-résistance et du pouvoir tuberculigène, critérium dont nous avons montré toute la fragilité.

Le dernier argument des tenants de l'unité bacillaire s'appuie sur quelques faits de transmission de la tuberculose humaine ou bovine aux volailles de basse-cour et réciproquement, sur des contaminations de l'homme par le perroquet, enfin sur les expériences classiques de Cadiot, Gilbert et Roger réalisant la tuberculose Villemin au moyen du bacille aviaire.

Que valent ces faits?

Il n'est pas douteux qu'Arloing a pu réussir à contaminer la poule par ingestion, là où Straus avait si longtemps échoué; que certains phtisiques ont pu, à la longue, communiquer à leur perroquet familier la tuberculose dont ils étaient atteints; de même la contamination des oiseaux de basse-cour par le gros bétail a été observé par Nocard et par Vallée. Les observations très scrupuleuses de ce dernier auteur ont un caractère d'authenticité indéniable; mais que prouvent-elles? Simplement que l'état réfractaire des oiseaux vis-à-vis du bacille des mammifères n'a rien d'absolu et que des doses massives répétées d'un bacille très virulent (dans les observations de Vallée il s'agissait spécialement du bacille bovin) peuvent, exceptionnellement et difficilement (les particularités anatomiques des lésions toutes locales le prouvent), triompher de la résistance habituelle de l'organisme des oiseaux. L'oiseau serait donc réceptif, mais de façon très inégale aux deux virus, comme il l'est à nombre de microbes. C'est la seule conclusion qu'on en puisse tirer. Mais ce n'est pas de cela qu'il s'agit et le problème à résoudre est tout autre.

Quant aux faits d'infection de l'homme par l'aviaire, ils sont tellement rares et passibles de tant de critiques, vu le rôle possible d'une contagion interhumaine dont n'ont pu tenir compte les observations, qu'il est permis de n'en pas faire état.

Restent les expériences de Cadiot, Gilbert et Roger où l'on voit l'inoculation de l'aviaire donner au cobaye une tuberculose franche. Quand on examine de près ces expériences, on s'étonne que leurs auteurs n'en aient pas tiré des conclusions diamétralement opposées. Qu'y voit-on en effet? Avec 11 lésions de gallinacés inoculées à 27 cobayes, les auteurs obtiennent 2 fois seulement des lésions tuberculeuses généralisées, 7 fois des lésions discrètes, 5 fois des lésions purement locales. Restent 13 cobayes, *soit près de la moitié* qui demeurent indemnes! Or quel est le tissu tuberculeux prélevé sur un mammifère qui fournirait d'aussi maigres résultats? Dans des expériences de ce genre, ce qu'on doit obtenir c'est tout ou rien; ou il s'agit d'une lésion avirulente, morte, non tuberculigène, ou il s'agit d'une lésion en activité et, en ce cas, c'est 100 p. 100 de succès que l'on devrait enregistrer avec le réactif sensible qu'est le cobaye. De même, les auteurs comme Arloing qui se sont essayés, non plus avec les lésions des gallinacés, mais avec les cultures en provenant pour tuberculiser le cobaye ont toujours noté une différence avec les résultats obtenus au moyen des cultures humaine ou bovine; et pourtant les injections ont été faites à dose relativement forte.

Avant de parler d'unité bacillaire, il faudrait, avec des doses extrêmement faibles *d'une émulsion bien homogène*, voisines de la dose limite (0 milligr. 000.000.05 par exemple), pouvoir tuberculiser régulièrement le cobaye, comme on peut le faire avec les cultures humaine ou bovine dans les mêmes conditions pondérales. Pareil résultat n'a jamais été obtenu.

En résumé la doctrine de l'unité bacillaire qui réduit les divers types au rang de simples races ou variétés d'une même espèce repose sur des bases insuffisantes et fragiles et sur une critique toute spéculative des arguments séparatistes. Cette doctrine fait table rase un peu légèrement de tous les caractères différentiels si soigneusement exposés dans le livre magistral de Straus. En sera-t-il de même de ceux que nous allons maintenant exposer et doivent-ils subir le même sort? Nous nous permettons d'en douter.

II. — Différences qui séparent certains bacilles aviaires du bacille des mammifères.

Une question préalable se pose qui n'est pas faite pour simplifier cette étude; n'y a-t-il qu'une sorte de B. aviaire? Il nous a paru, en examinant un assez grand nombre d'échantillons, provenant de saisies de volailles, obligeamment fournis par le laboratoire du professeur Vallée, que les bacilles des oiseaux étaient loin de se ressembler entre eux, mais, écartant délibérément l'étude d'un problème aussi considérable, nous nous sommes limité à l'examen de trois échantillons qui nous ont paru se rapprocher au maximum du B. des mammifères. L'un avait été isolé des viscères d'une dinde, les autres du foie de deux poulets qui présentaient la chaîne ganglionnaire cervicale classique, des marbrures et tubercules du foie et de la rate et, phénomène assez exceptionnel, des tubercules de la moelle osseuse. Il s'agissait donc, non pas de la forme usuelle septicémique suraiguë, mais d'une forme subaiguë à bacilles peu virulents et rares dans les frottis d'organes. Les cultures fournies étaient relativement sèches et verruqueuses comme dans la tuberculose des mammifères. Enfin les éléments bacillaires, longs d'1 μ, étaient d'apparence régulière et très homogène. Au total l'analogie avec le type humano-bovin était aussi accentuée que possible. Nous avons pensé que si dans de telles conditions subsistait entre ces trois échantillons et le bacille de Koch classique une différence de fond, la démonstration de dualité n'en aurait que plus de valeur, et, bien que *nos conclusions séparatistes ne soient logiquement valables que pour les trois types étudiés*, elles n'en sont pas moins de nature à discréditer l'ensemble de la doctrine unitaire.

Particularités histo-chimiques.

a) Substance unissante. — La facilité avec laquelle s'obtiennent les émulsions de B. aviaire, leur peu de cohésion dans les cultures en voile devaient faire présumer que la phytoglée, la substance unissante si abondante chez le bacille des mammifères, devait être fort réduite.

Et en effet, soumis aux colorations basiques les plus fortes et les plus variées, les bacilles prélevés sur les cultures en voile de nos trois échantillons nous sont apparus complètement libres et dénudés. La substance intercalaire n'existait donc pas ou ne ressemblait en rien à celle qui caractérise le bacille des mammifères.

b) Réaction des milieux de culture. — On sait que le bacille de Koch modifie en se développant la réaction du bouillon glycériné et que Th. Smith a cru trouver dans l'inégalité de cette réaction un moyen de distinguer les bacilles de l'homme et du bœuf. Des résultats contradictoires ont enlevé à cette épreuve toute valeur indicatrice, mais peut-être pourrait-on l'utiliser pour le bacille aviaire. J'ai en effet constaté que si la plupart des bacilles humains et bovins acidifient à un moment donné le bouillon glycériné, il n'en est pas de même des milieux de culture de l'aviaire qui demeurent presque indéfiniment neutres. La même différence s'observe avec les décoctions de corps bacillaires.

Vitalité.

La longévité du bacille aviaire cultivé sur milieux à base de pomme de terre nous a paru remarquable (deux ans quelquefois). La persistance de cette végétabilité contraste avec la baisse rapide de la virulence que nous n'avons pu maintenir plus de trois mois. Il y a là une dissociation bien plus tranchée que chez le bacille des mammifères dont l'ensemble des propriétés vitales s'éteint parallèlement. Cultivé un mois sur pomme glycérinée et maintenu ensuite à l'obscurité d'une cave à 15° en tube scellé, le bacille des mammifères dure tout au plus huit ou dix mois. Cette végétabilité du bacille aviaire est à rapprocher de sa faculté de reproduction, de la facilité de ses cultures comme de sa pullulation septicémique. Il y a là une exubérance de vie qu'on ne retrouve pas chez le bacille de Koch.

Propriétés des bacilles morts.

Action locale. — Une des caractéristiques du bacille de Koch normal non modifié par des artifices de culture est son

pouvoir nécrosant, pouvoir qui résiste à la plupart des moyens physiques et chimiques de stérilisation.

Chez le bacille aviaire cette propriété est de second plan et même quand l'infection bacillaire affecte le type Villemin, la proportion de caseum contenu dans les plus gros nodules est fort réduite. C'est en effet, vers le type fibreux qu'évolue le tubercule aviaire. En fait c'est avec le bacille aviaire qu'on réalise expérimentalement les plus belles cirrhoses tuberculeuses. Au poumon, les phénomènes congestifs et surtout la pneumonie épithéliale l'emporteront sur les processus nécrotiques ordonnés ou diffus.

J'ai cherché à mettre en relief et à mesurer, en quelque sorte, ce pouvoir nécrogène des bacilles morts de la façon suivante :

On stérilise des cultures jumelles soit par l'éther, soit par chauffage prolongé à basse température et on inocule les bacilles morts à comparer en des points symétriques sous la peau du cobaye. On peut ainsi étudier de jour en jour la réaction inflammatoire, puis destructive, amenée par un poids connu de bacilles, ce qui permet d'évaluer et de classer le pouvoir nécrosant de telle ou telle race de bacilles. Les animaux sont sacrifiés du huitième au dixième jour et le caséum est pesé.

Une série de cobayes est ainsi inoculée dans l'aine d'un côté avec des bacilles humains, de l'autre avec des bacilles aviaires âgés de trois semaines. Le premier cobaye reçoit 1 milligramme + 1 milligramme du côté opposé ; le deuxième 2 + 2 ; le troisième 5 + 5 ; le quatrième 10 + 10 et ainsi de suite de 5 en 5 jusqu'à 40 milligrammes.

A l'autopsie, le caséum est *toujours* moins abondant du côté aviaire que du côté humain ou bovin (la moitié ou le quart). Le pus formé, bien plus fluide, est histologiquement et chimiquement très différent dans l'abcès des bacilles aviaires, enfin la pyogénie exige un minimum de 3 milligrammes de corps bacillaires essorés pour l'aviaire, tandis qu'avec le bacille des mammifères le pus se forme déjà avec 1 milligramme. Quant à l'ulcération cutanée qui exige un minimum de 20 milligrammes de bacilles aviaires, elle se produit avec 10 milligrammes pour la plupart des bacilles des mammifères, quelquefois avec 5 ou même 4 milligrammes seulement.

Ces expériences, renouvelées plusieurs fois avec nos différents échantillons de bacille aviaire, opposés chaque fois à des bacilles de l'homme ou du bœuf, ont toujours fourni des résultats concordants. Comme nous les avons depuis vérifiés sur d'autres échantillons nous conclurons que les poisons adhérents diffèrent profondément dans les deux races de bacilles.

Il y a dans cette puissance de mortification du bacille de Koch un fait réellement bien particulier et qui à lui seul suffirait à

individualiser ce type de microbes, car s'il est possible d'en diminuer artificiellement l'énergie, s'il est possible de priver un bacille de Koch de ses propriétés tuberculigènes et nécrosantes et de lui donner ainsi quelque analogie avec le bacille aviaire, la réciproque n'est pas vraie et aucun procédé n'a pu jusqu'ici modifier la virulence de l'aviaire et le rendre assez offensif pour qu'il soit nécrogène et franchement caséifiant. Dans toutes ces expériences de transformisme, il est plus facile d'atténuer que d'exalter.

Action générale. — Nous l'avons étudiée chez le cobaye et chez le cheval. A la dose de 2 à 10 milligrammes nos bacilles aviaires, injectés dans les veines ou dans les muscles du cobaye, ont produit une cachexie bien plus marquée que ne le fait dans les mêmes conditions le vrai bacille de Koch.

Chez le cheval, l'injection intraveineuse de doses de 25 à 100 milligrammes de bacilles aviaires tués par l'éther produit des accidents d'une gravité exceptionnelle (hyperthermie dépassant 41°, diarrhée, anorexie). Les effets peuvent se prolonger plusieurs jours. Avec l'humain ou le bovin rien d'analogue; les effets toxiques sont infiniment moins marqués et durent à peine vingt-quatre heures.

La prolongation de l'effet toxique et spécialement de la fièvre avec le bacille aviaire mort est un phénomène assez difficilement explicable. On peut se demander s'il dépend d'une insolubilité spéciale des corps bacillaires, dont la résorption se ferait plus lentement que celle du bacille humain. Il ne le semble pas, car, avec des autolysats bien limpides obtenus par macération dans la solution physiologique, on obtient des résultats analogues, un peu moins prolongés il est vrai, mais toujours extrêmement violents et assez durables.

Action des tuberculines.

Un des principaux arguments invoqués par les tenants de la doctrine de l'unité des divers bacilles serait l'analogie de leurs tuberculines, qui, à la différence d'activité près, donneraient les mêmes réactions biologiques. Cependant Straus, Borrel, Burnet, de Jong, Bang tiennent la tuberculine aviaire pour

moins toxique que celle du bacille humano-bovin et Reeser va jusqu'à lui refuser toute toxicité ; mais il demeure acquis, en général, que les deux tuberculines provoquent des réactions thermiques de même ordre chez l'animal tuberculeux, et que « les différences relevées entre deux types de tuberculines ne sont pas suffisantes pour conclure qu'il s'agit de produits distincts ».

On sait que l'étude des tuberculines s'effectue (l'analyse chimique étant impuissante à les caractériser) par trois catégories de recherches indirectes portant sur leurs effets locaux, leurs effets généraux, leur toxicité.

a) Effets locaux. — Dans un travail publié en 1914 (1), j'ai pu dire que certaines des réactions biologiques de la tuberculine aviaire, notamment la cuti-réaction, plaidaient en faveur de l'unité des races bacillaires ; mais les quelques essais que j'avais exécutés à cette époque avaient porté sur une tuberculine préparée avec un seul échantillon provenant du perroquet. Les résultats, il faut le reconnaître, avaient approché ceux de la tuberculine classique ; mais, avec les trois bacilles (dinde et poulet) qui m'ont servi depuis ces recherches, les résultats ont été tout autres, c'est-à-dire à peu près nuls. La différence de technique pouvant expliquer ces contradictions, je me suis cette fois servi de tuberculines préparées avec des poids strictement égaux de corps bacillaires provenant de cultures de même âge effectuées sur pomme de terre et ayant subi la même durée de décoction dans un même volume (50 parties) de bouillon glycériné, bref, de produits exactement comparables entre eux ; en outre j'ai utilisé non la cuti-réaction, mais l'intradermo- qui permet une mesure précise de la substance employée. Enfin j'ai préparé, pour servir de témoins, des extraits de cultures variées (coli, staphylocoque et pyocyanique) dont les corps microbiens recueillis, essorés et pesés avaient été épuisés également à chaud dans 50 volumes de bouillon glycériné.

Il importe, en effet, de se rappeler qu'aucune des réactions tant locales que générales de la tuberculine ne possède de

(1) André Jousset, Etude de la tuberculine. *Rev. de la Tub.*, 1914-15, nº 5, p. 311.

spécificité absolue et que c'est seulement par leur grandeur qu'elles acquièrent une valeur distinctive; que la question n'est pas tant de savoir si les tuberculines aviaire et humaine se comportent à peu près de même, que de savoir si la différence de leurs effets reste dans les limites de la spécificité. Or, l'expérience le démontre, les cuti-réactions effectuées chez des tuberculeux au moyen des produits aviaires, quand elles ne sont pas nulles, sont toujours très médiocres en regard de celles que donnent les tuberculines humaine et bovine (toujours égales entre elles), et sont même moins accusées que certaines réactions irritatives banales fournies par des extraits bactériens n'ayant rien à voir avec le bacille de Koch.

Dans une série d'essais effectués sur des malades de mon service de l'hôpital Laënnec, j'ai en effet constaté nombre de fois la formule suivante :

Tuberculine humaine	+ +
— bovine	+ +
— aviaire	0
Colibacilline	0
Staphylococcine	0
Pyocyanine	+

Jamais la tuberculine aviaire ne m'a donné dans ces conditions de réaction supérieure à celle du staphylocoque et du colibacille et elle s'est presque toujours montrée moins active que la pyocyanine. J'ai déjà signalé cette curieuse similitude du pyocyanique et du bacille de Koch à propos des séro-précipitines (1).

En résumé, par leurs réactions cutanées, les tuberculines issues du bacille des oiseaux agissent comme des substances irritantes banales et, par leur faible activité, se séparent complètement de la tuberculine des mammifères; c'est là un résultat des plus nets et *qui paraît indépendant de la virulence des cultures.*

b) Effets généraux. — La discrimination des tuberculines se fait moins facilement par l'étude des propriétés générales du poison que par celle des réactions locales. La marche de la tem-

(1) *Loc. cit.*, p. 308.

pérature chez l'animal tuberculeux, procédé habituellement adopté pour ce genre de recherches, constitue un mauvais critérium; une foule de substances provoquent la fièvre chez l'animal tuberculeux. Il faut donc, pour juger la question, utiliser également les réactions témoins au moyen d'extraits quelconques. De plus, si l'on choisit le cobaye, la recherche n'est rigoureuse qu'avec des moyennes établies sur de grandes séries, à cause de la faiblesse des écarts thermiques.

Voici un exemple de ce que j'ai observé dans ces conditions :

Cinq lots de 20 cobayes tuberculisés depuis deux mois reçoivent 10 milligrammes (par cobaye) de tuberculines ou pseudo-tuberculines diverses.

La température maxima moyenne atteinte, de la troisième à la cinquième heure qui suit l'injection hypodermique, est dans chaque lot de :

40°85	pour la	T. A. (bovine).
40°72	—	T. A. (humaine).
40°63	—	pyocyanine.
40°02	—	tuberculine aviaire.
39°95	—	staphylococcine.

La même expérience recommencée avec une dose de 50 milligrammes de tuberculine m'a donné des résultats moins nets, car la dose étant très toxique la moitié des cobayes mouraient le lendemain, d'où de grandes inégalités dans le même lot, certains animaux ne réagissant pas du tout et faisant d'emblée de l'hypothermie.

On voit, en somme, que chez le cobaye tuberculeux beaucoup d'extraits microbiens sont susceptibles de produire de la fièvre, mais les tuberculines humaine et bovine se distinguent par des réactions thermiques un peu plus fortes. Cette différence n'existe pas pour la tuberculine aviaire.

Mais ce que l'organisme tuberculeux ne peut faire, l'organisme sain peut le réaliser. Le contraste est bien connu entre l'inaction de la tuberculine de Koch chez l'animal neuf et son activité chez l'animal tuberculeux. Or, cette opposition ne se retrouve plus avec la tuberculine aviaire. Il y a presque égalité entre les réactions fébriles du sujet sain et du sujet malade et ceci achève de classer cette substance à côté des poisons non spécifiques tels que la pyocyanine, la staphylococcine, la colibacilline qui tous sont bien plus pyrétogènes sur l'organisme neuf que la vieille tuberculine de Koch.

c) Toxicité. — Il était à prévoir que des effets analogues se

retrouveraient dans la mesure de la toxicité de ces divers extraits.

La tuberculine aviaire peut tuer le cobaye tuberculeux comme le fait la tuberculine classique, mais quand on opère sur de grandes séries, et nous l'avons fait sur plusieurs centaines d'animaux, on voit que le pourcentage de mortalité est toujours très inférieur à dose égale de poison et, à tuberculose égale, à celui que donne la tuberculine classique. Ici encore la toxicité du poison aviaire ne dépasse pas celle des pseudo-tuberculines témoins.

Par contre, chez l'animal sain la tuberculine aviaire est susceptible de produire des effets très graves, plus graves que ceux de la tuberculine ordinaire tout en restant inférieurs à ceux de la colibacilline et surtout de la pyocyanine.

Il y a dans toutes ces expériences une interversion, un croisement des propriétés des tuberculines aviaire et humano-bovine qui n'ont jamais, que nous sachions, été signalés et d'où il ressort que le bacille aviaire possède une toxicité véritable que le bacille de Koch est loin d'atteindre.

Pouvoir immunogène.

Malgré tout l'intérêt que présentent les réactions d'immunité pour la différenciation des espèces microbiennes, aucune recherche d'ensemble n'a utilisé les effets de la vaccination bacillaire pour trancher la question de l'unité ou de la dualité des tuberculoses. Nous les considérons comme l'argument principal de ce travail.

Le problème pouvait être abordé de trois manières :

- Par l'étude des effets directs de la vaccination, c'est-à-dire de l'immunité conférée;
- Par la recherche des anticorps ;
- Par la mesure du pouvoir thérapeutique du sérum des vaccinés.

I. — Chez le lapin, Grancher et Ledoux-Lebard; chez le cobaye, Bordet; chez le veau, Mac Fadyean auraient obtenu un certain degré de résistance à l'égard du bacille de Koch au moyen de vaccins aviaires, mais de l'aveu même des expérimen-

tateurs, les résultats ont été si incomplets qu'on peut se demander s'ils n'auraient pas été obtenus avec un antigène quelconque ; en outre il y manque le témoignage d'une inoculation comparative avec le bacille de Koch ordinaire :

J'ai repris des essais analogues chez le cobaye avec la technique suivante.

On pratique sur trois lots considérables d'animaux des injections intracardiaques hebdomadaires d'émulsions de bacilles bovin, humain, aviaire obtenus dans les mêmes conditions de culture, sur milieu artificiel à base de glycocolle, et tués à basse température (50°).

Beaucoup d'animaux, quelquefois les 2/3 d'un lot, succombent après quelques semaines d'immunisation. On arrête celle-ci lorsque chaque animal a reçu en tout la dose énorme pour un cobaye de 50 milligrammes de bacilles.

Après un repos de deux mois où les survivants récupèrent leur poids primitif, considérablement diminué, on procède à une inoculation d'épreuve avec une culture humaine peu virulente, tuant les témoins en cinq ou six mois à la dose de 0 milligr. 005 (voie sous-cutanée).

Les animaux des lots humain et bovin sacrifiés au neuvième mois sont trouvés porteurs d'une tuberculose presque exclusivement ganglionnaire avec rares granulations spléniques ; chez aucun d'eux le foie et les poumons ne sont touchés ; chez quelques-uns on trouve un épanchement pleural séro-fibrineux, traduction d'une tuberculose très atténuée.

Tous les animaux du lot aviaire meurent avant le sixième mois, par conséquent dans les mêmes délais que les témoins, avec dans l'ensemble une tuberculose analogue à celle des non-vaccinés, c'est-à-dire portant sur l'ensemble des viscères y compris les poumons.

Cette tentative de vaccination, quelque imparfaite qu'elle soit, montre donc à l'évidence qu'une différence fondamentale sépare l'antigène bacillaire, provenant de l'homme ou du bœuf, de l'antigène aviaire, car les mêmes causes devraient produire les mêmes effets.

II. — La recherche des anticorps dans le sérum des vaccinés est assez décevante; elle fournit des résultats irréguliers, sauf peut-être pour l'agglutination où la scission des types aviaire et humain apparaît nettement.

Je l'ai essayée en comparant successivement :

A. La floculation obtenue sur des émulsions bovines, humaines et aviaires au moyen du sérum de chevaux solidement immunisés par le bacille des mammifères.

B. Celle que donnent les mêmes émulsions avec un sérum anti-aviaire. Dans les deux cas les chevaux sont préparés par des injections veineuses

bi-hebdomadaires de bacilles vivants aux doses progressives de 10 à 300 milligrammes.

Comme émulsion j'ai choisi celle que préconise Wright, consistant en bacilles prélevés sur pomme de terre après un mois de culture, stérilisés dix minutes à 105°, broyés dans l'eau salée à 3 gr. pour 1.000 et longuement centrifugés de façon à reproduire l'opalescence d'un étalon construit avec un quart de milligramme de bacilles secs par cent. cube. La stabilité de l'émulsion doit être telle qu'on n'observe aucun dépôt appréciable spontané avant une semaine. La floculation se juge à l'œil nu dans de petits tubes à essai après deux heures d'étuve. Cette technique donne des résultats très supérieurs à celle des cultures vivantes homogènes.

Voici un exemple des résultats obtenus :

		Sérum A (anti-bovin)	Sérum B (anti-aviaire)
		—	—
B. humain I. . .	Agglutine au	1 : 400e	1 : 20e
— II. . .	—	1 : 300e	1 : 20e
— III. . .	—	1 : 450e	1 : 50e
B. bovin I. . .	—	1 : 350e	1 : 50e
— II. . .	—	1 : 400e	1 : 50e
B. aviaire I. . .	—	1 : 20e	1 : 100e
— II. . .	—	1 : 50e	1 : 100e
— III. . .	—	1 : 10e	1 : 50e

Le peu de différence des chiffres de la série B est probablement imputable à la pauvreté de ce sérum en anticorps, l'immunisation des chevaux n'ayant pu, à cause de la toxicité de l'aviaire, être poussée très avant; mais les écarts des taux d'agglutination entre le groupe aviaire et le groupe humano-bovin dans la série B. sont très supérieurs aux légères variations qui peuvent séparer les différents types d'un même groupe et la différenciation par ce procédé apparaît assez nette.

Il n'en est malheureusement pas de même pour la mesure des précipitines, des opsonines et des sensibilisatrices dont les résultats ont été, entre nos mains, des plus contradictoires; aussi n'avons-nous pas poursuivi ce genre de recherches.

III. — J'ai surtout utilisé pour la différenciation des bacilles tuberculeux les sérums de chevaux longuement immunisés (un de ces animaux a reçu en six ans 454 inoculations) par des injections intraveineuses de bacilles morts, de substance bacillaire de nature lipoïdique et de bacilles vivants très atténués, à virulence tellement diminuée que leur inoculation sous-cutanée au cobaye à la dose de 4 milligrammes ne produisait qu'un petit

abcès local sans adénopathie ni généralisation. Je suis arrivé à faire supporter à certains chevaux des doses colossales de ces produits et à obtenir avec régularité des sérums doués de propriétés thérapeutiques solides que j'utilise avec succès dans le traitement des tuberculoses aiguës de l'homme.

Il devenait donc intéressant d'en étudier la valeur chez le cobaye (1) et de comparer chez l'animal l'action du sérum correspondant à chaque type de bacilles. En fait, je me suis limité à l'humain et à l'aviaire.

Dans une première expérience j'ai pratiqué parallèlement chez deux chevaux, pendant cinq mois, des inoculations bi-hebdomadaires de bacilles. Résultat médiocre avec le sérum du cheval préparé par l'humain, nul avec le cheval anti-aviaire. Il est vrai que celui-ci avait beaucoup plus souffert des inoculations et qu'il avait considérablement maigri.

Dans un second essai, deux chevaux T... et G... reçoivent, l'un des extraits solubles humains, l'autre des extraits aviaires à doses strictement égales ; les préparations sont mieux supportées et on arrive à pousser l'immunisation assez loin. Malgré tout le sérum T. acquiert une activité assez faible ; il est vrai qu'elle est nulle avec le sérum G.

Enfin chez une jument extraordinairement résistante, Bobette, j'ai pu, pendant plusieurs années, alterner en les coupant par des périodes de repos des inoculations de bacilles humains et aviaires. Toutes les saignées correspondant à l'immunisation par bacilles humains ont fourni d'excellents sérums, *mais la valeur du sérum s'abaissait à chaque série de bacille aviaire pour se relever avec le bacille humain.*

Les expériences précédentes, spécialement la dernière, ont fourni des résultats d'une netteté surprenante. Ce sont elles qui nous orienté vers la conception du dualisme bacillaire à laquelle nous n'étions nullement préparé et qui nous ont amené à une révision de la théorie uniciste. Directes ou indirectes, ces réactions d'immunité marquent le fossé profond qui sépare les antigènes d'origine aviaire des antigènes d'origine humaine ou bovine. Si la spécificité de telles réactions n'est pas un vain mot, si elles présentent bien le caractère absolu qu'on s'accorde généralement à leur reconnaître, elles jugent définitivement la question et il devient inutile de pousser plus avant l'étude des caractères différentiels.

(1) Cet essai qui permet de titrer la valeur du sérum est pratiqué couramment dans notre laboratoire ; il est indispensable avant l'application à l'homme. (Voir André Jousset, Sérothérapie antituberculeuse, in *Journal médical français* de décembre 1918).

III. — Résumé et conclusions.

Il ressort de l'exposé précédent que *certains* bacilles aviaires possèdent une série de caractères naturels bien tranchés qui leur assurent une autonomie absolue et ne permettent pas de les assimiler au bacille décrit par Koch chez l'homme et chez le bœuf.

Ces caractères, de valeur très inégale, sont les suivants :

Absence de substance unissante.

Invariabilité de la réaction du milieu de culture.

Longévité sur milieux artificiels opposée à la fragilité de la virulence.

Médiocrité du pouvoir caséifiant local.

Toxicité intense pour le cheval.

Faiblesse et banalité des effets locaux ou généraux de la tuberculine, extraite de ces bacilles, sur l'organisme tuberculeux.

Absence de tout pouvoir immunogène spécifique à l'égard du bacille de l'homme ou des bovidés.

De cet ensemble de propriétés, deux surtout méritent d'être retenues qui séparent radicalement les types étudiés du bacille des mammifères : ce sont les réactions nécrotiques et les réactions d'immunité ; les autres n'ont qu'une valeur relative.

Les bacilles présentant de telles propriétés sont-ils exceptionnels? Tout porte à croire qu'ils sont, sinon constamment, au moins très fréquemment en cause dans la tuberculose des oiseaux. Cette impression résulte de l'analogie des caractères qui précèdent avec ceux qu'on a de tout temps signalés dans la tuberculose des volailles et qui avaient conduit Villemin, puis Straus, à douter de la parenté des deux maladies. Il serait toutefois imprudent de généraliser et plus dangereux encore de vouloir subordonner la question au problème tout spéculatif et philosophique de l'unité originelle des divers bacilles tuberculeux, qui n'a servi qu'à semer la confusion et aurait dû rester en dehors du débat.

Considérant la question du simple point de vue pratique nous conclurons donc :

Que la tuberculose des oiseaux relève de causes multiples où figurent :

1° *Très exceptionnellement* le bacille tuberculeux des mammifères;

2° *Très fréquemment* des bacilles acido-résistants doués occasionnellement d'un certain pouvoir tuberculigène ;

Que la propriété tuberculigène, aussi régulière et parfaite (pouvoir nécrosant) chez le premier type de bacilles qu'elle est irrégulière et imparfaite chez le second, ne justifie en rien l'identification des deux groupes.

Que les deux types de bacilles se distinguent quelquefois de façon absolue par leurs réactions d'immunité.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1920

par JULES VIALA, Préparateur au Service antirabique.

Pendant l'année 1920, 1.126 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : 6 sont mortes de la rage, soit une proportion brute de 0,53 p. 100.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	1.126
Morts	6
Mortalité p. 100	0,53

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1904	755	3	0,39
1887	2.770	14	0,79	1905	721	3	0,41
1888	1.622	9	0,55	1906	772	1	0,43
1889	1.830	7	0,38	1907	786	3	0,38
1890	1.540	5	0,32	1908	524	1	0,19
1891	1.559	4	0,25	1909	467	1	0,21
1892	1.790	4	0,22	1910	401	0	0,00
1893	1.648	6	0,36	1911	341	1	0,29
1894	1.387	7	0,50	1912	395	0	0,00
1895	1.520	5	0,38	1913	330	0	0,00
1896	1.308	4	0,30	1914	373	0	0,00
1897	1.529	6	0,39	1915	654	1	0,15
1898	1.465	3	0,20	1916	1.388	3	0,21
1899	1.614	4	0,25	1917	1.543	4	0,26
1900	1.420	4	0,28	1918	1.803	3	0,16
1901	1.321	5	0,38	1919	1.813	3	0,16
1902	1.005	2	0,18	1920	1.126	6	0,53
1903	628	2	0,32				

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1920 :

ANNÉE 1920	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A. .	24	0	0	50	0	0	36	0	0	86	0	0
Catégorie B. .	49	2	4,65	245	2	0,81	241	1	0,41	554	5	1,36
Catégorie C. .	13	1	7,69	259	0	0	209	0	0	486	1	»
	86	3	3,25	554	2	0,36	486	1	0,34	1.126	6	0,53

Répartition par départements des 1.126 personnes traitées mordues en France.

Aisne	14	Dordogne	4
Allier	9	Eure	16
Ardennes	12	Eure-et-Loir	3
Aube	7	Finistère	48
Aveyron	2	Garonne (Haute-)	4
Calvados	7	Ille-et-Vilaine	21
Cantal	19	Indre	10
Charente	3	Indre-et-Loire	19
Cher	15	Loir-et-Cher	12
Corrèze	10	Loiret	23
Côte-d'Or	8	Loire-Inférieure	38
Côtes-du-Nord	30	Lot	3
Creuse	19	Maine-et-Loir	7
Deux-Sèvres	19	Marne	2

Marne (Haute-)	6	Saône-et-Loire	11
Mayenne	5	Sarthe	3
Meurthe-et-Moselle	3	Seine	387
Meuse	41	Seine-et-Marne	8
Morbihan	41	Seine-et-Oise	80
Moselle	4	Seine-Inférieure	24
Nièvre	4	Somme	16
Nord	4	Tarn	4
Oise	5	Vendée	20
Orne	4	Vienne	19
Pas-de-Calais	10	Vienne (Haute-)	9
Puy-de-Dôme	22	Vosges	4
Pyrénées (Basses-)	2	Yonne	6

* * *

PERSONNES TRAITÉES MORTES DE LA RAGE APRÈS LE TRAITEMENT.

Cléret (Armand), quarante-cinq ans, demeurant à Colombes (Seine). Mordu le 12 janvier au pouce droit : trois morsures pénétrantes qui ont saigné.

Traité du 13 janvier au 6 février.

Pris de rage le 12 mars. Mort à l'hôpital Pasteur le 14 mars.

Chien reconnu enragé par M. Bonnote, vétérinaire à Colombes.

Le bulbe de Cléret inoculé aux animaux a donné la rage le dix-septième jour.

Bunel (Pierre), quinze ans, demeurant à Antony (Seine). Mordu le 16 février au mollet gauche : deux morsures profondes qui ont saigné.

Traité du 18 février au 6 mars.

Pris de rage le 28 mai. Mort à l'hôpital Pasteur le 30 mai.

Chien reconnu enragé à la Fourrière.

Bide (Louis), trente-quatre ans, demeurant à Alfortville (Seine). Mordu le 19 mars à l'arcade sourcilière gauche : deux morsures profondes qui ont saigné.

Traité du 22 mars au 15 avril.

Pris de rage le 13 juin. Mort à l'hôpital Pasteur le 15 juin.

Chien errant qui a disparu après avoir mordu.

Le bulbe de Bide inoculé à des animaux a donné la rage le dix-neuvième jour.

Gisseleire (Julienne), trente-cinq ans, demeurant à Paris (Seine). Mordue le 19 mars au nez : trois morsures profondes.

Traitée du 19 mars au 15 avril.

Prise de rage le 12 janvier 1921.

Meurt le 15 janvier.

Chien reconnu enragé par M. Giraud, vétérinaire.

Vernay (Joseph), cinquante-neuf ans, demeurant à Vigneux (Seine-et-Oise). Mordu le 19 mars aux lèvres.

Traité du 10 avril au 4 mai.

Pris de rage le 29 juin. Mort à l'hôpital Pasteur le 2 juillet.

Chien reconnu enragé à l'Ecole vétérinaire d'Alfort.

Une autre personne mordue aux lèvres par le même animal, et traitée à l'Institut Pasteur, se porte bien.

Demarcy (Jean), quarante-huit ans, vétérinaire, demeurant à Courbevoie (Seine). Mordu le 20 juin à l'index gauche : trois morsures pénétrantes qui ont saigné.

Traité du 21 juin au 15 juillet.

Pris de rage le 11 octobre. Mort à l'hôpital Pasteur le 13 octobre.

Chien reconnu enragé par M. Demarcy.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette

T. XXXV. — 1921. Octobre — Nº 10.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XVe)

Les annonces sont reçues à l'Économat de l'Institut Pasteur.

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . FRANCE . . . . **45 fr.**
— — — — . . . . UNION POSTALE. **55 fr.**
Prix du numéro, — — . . . . **4 fr.**

Années antérieures — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892, 1893 et 1897 à 1919 se vendent séparément **28** francs.
Les années 1887 (volume I), 1893, étant très rares, ne se vendent pas séparément.
TABLES DES MATIÈRES, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 10

Page

35e ANNÉE OCTOBRE 1921 N° 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

BACILLE SEMBLABLE AU BACILLE DU ROUGET DU PORC RENCONTRÉ DANS LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN D'UN MÉNINGITIQUE

par J. DUMONT et L. COTONI.

Origine.

Le microbe qui fait l'objet de cette étude a été trouvé en 1918 dans le liquide cérébro-spinal d'un soldat italien, âgé de vingt-quatre ans, mort de méningite en Champagne. Cet homme fut transporté à l'ambulance dans un état d'obnubilation voisin du coma, et l'on ne put avoir aucun renseignement sur l'histoire de sa maladie. Il présentait, à son entrée, un syndrome méningitique des plus manifestes, le thermomètre marquait 40°, le pouls battait à 120, l'examen du malade ne montrait les vestiges d'aucun traumatisme cranien ni d'aucune otite et demeurait muet pour tout autre appareil que le système nerveux. Une première ponction lombaire donna issue à une vingtaine de centimètres cubes de liquide jaillissant en jet. Ce liquide, trouble, très albumineux, très fibrineux, ne réduisait pas la liqueur de Fehling; la centrifugation fournissait un culot peu abondant, formé de nombreuses hématies et de globules blancs (lymphocytes et mononucléaires, 40 p. 100; polynucléaires, 60 p. 100). Un examen microscopique particulière-

ment attentif ne permettait d'y déceler ni méningocoque ni bacille tuberculeux, mais de très rares *bacilles colorables par la méthode de Gram*, fins, rectilignes, à bouts carrés, la plupart extra-leucocytaires, isolés ou groupés par deux l'un à la file de l'autre, quelques-uns intraleucocytaires, isolés ou groupés par deux ou quatre, parallèlement, à l'intérieur des polynucléaires. L'ensemencement sur gélose fournissait, après vingt-quatre heures, une culture pure de ces bacilles.

40 cent. cubes de sérum antiméningococcique avaient été par prudence injectés dans le canal rachidien du malade. Le lendemain, son état s'aggravait : coma, température de 41°5, sueurs. Le liquide extrait lors d'une seconde ponction lombaire montra à l'examen macroscopique et microscopique les mêmes caractères que le précédent, et l'ensemencement fournit le même résultat. A ce jour, l'examen du sang révéla une forte polynucléose, mais l'hémoculture (ensemencement de 5 cent. cubes de sang) demeura négative.

Une seconde injection de sérum antiméningococcique fut pratiquée contre tout espoir, mais le malade succomba la nuit suivante; la température atteignait à ce moment 42°5. Il est infiniment regrettable qu'on n'ait pu pratiquer l'autopsie; les résultats de l'étude bactériologique n'en sont pas moins dignes d'être relatés.

Caractères du bacille.

Dans divers milieux de culture, il se présente sous l'aspect d'un bacille remarquablement petit, mince et fin, de forme régulière presque toujours rectiligne, beaucoup plus rarement un peu incurvée; ses extrémités offrent un aspect souvent nettement tranché. Les corps microbiens sont isolés ou groupés en petits amas ou encore disposés en courtes chaînes de deux à quatre individus. Dans les humeurs et les frottis d'organes des animaux infectés, l'aspect est identique. Ce bacille est immobile, n'a pas de spores, ni de capsule décelable par les procédés habituels, et se colore par la méthode de Gram.

Il se développe aisément sur les milieux de culture courants, plus lentement à 15° qu'à 37°. Dans le *bouillon Martin*, la culture, peu abondante, atteint sa plus grande richesse avant

vingt-quatre heures; on note un aspect trouble uniforme et un léger dépôt tassé au fond du tube. L'agitation montre des ondes soyeuses, tandis que le dépôt microbien disparaît au sein du liquide. Pas d'odeur appréciable de la culture (1). La réaction du milieu, après vingt-quatre heures, demeure légèrement alcaline comme avant l'ensemencement. Dans le *bouillon Martin additionné de liquide d'ascite ou de sérum*, dans le *bouillon glucosé*, l'aspect est le même, mais l'abondance est plus grande, comme dans le *milieu T* (eau peptonisée à 4 p. 100, glucosée à 0,2 p. 100, salée à 0,5 p. 100). Sur la *gélose Martin* inclinée, on voit de petites colonies arrondies, dont le diamètre ne dépasse guère 2 millimètres, bleutées par transparence, grisâtres par réflexion, à centre légèrement saillant, à bords un peu dentelés. L'examen au faible grossissement montre des bords finement mamelonnés et un centre granuleux. La gélose ensemencée en strie porte dès le second jour une traînée translucide, ayant la même couleur que les colonies isolées, à bords un peu dentelés. Le développement microbien s'est montré plus riche sur la *gélose à l'œuf*, la *gélose au sang* : dans ce dernier milieu, aucune modification qui décèle l'hémolyse.

L'aspect des cultures en *gélatine* (bouillon Martin gélatiné à 15 p. 100) est quelque peu particulier. Nous n'insisterons pas sur les plaques, où les colonies régulièrement arrondies, d'un blanc laiteux, n'ont rien de caractéristique, mais sur les piqûres. Dans ce dernier cas, en ensemençant le milieu avec une culture ou le sang d'un animal infecté, on retrouve les aspects fournis par le bacille du rouget et décrits par plusieurs observateurs; nous empruntons quelques traits de la description à l'étude faite autrefois par l'un de nous sur divers échantillons de bacille du rouget.

Le développement bactérien devient visible vers le troisième jour. Plus tard, on note la présence de deux variétés principales, bien distinctes, de colonies, dont la proportion mutuelle peut varier avec l'âge de la culture. Les unes (type *grenu*), plus petites qu'une tête d'épingle, offrent des contours ronds bien arrêtés ; les autres (type en *houppe*), plus franchement

(1) Notre microbe, ensemencé dans la gélose au plomb, n'a pas produit de noircissement.

blanches, floconneuses, pouvant atteindre un demi-centimètre de diamètre, à bords estompés, nuageux, mal limités, se développent généralement plus tard que les précédentes, à des niveaux variables du tube de culture. La gélatine ensemencée depuis plusieurs semaines peut présenter des colonies d'aspect encore différent, en *pinceau court* et en *bois de cerf*, ou offrir une apparence nuageuse, blanchâtre, due à la coalescence des colonies en houppe. A la surface de la gélatine, on observe une tache blanche à peine surélevée, limitée par des bords irréguliers ; à ce niveau, la végétation demeure minime. Nous n'avons jamais observé de liquéfaction de la gélatine, même dans des cultures âgées de six mois.

Sur le *sérum équin coagulé*, les colonies, fines, ne sont nullement caractéristiques ; sur la *pomme de terre*, le développement peu abondant du microbe produit une mince traînée légèrement brillante et dégage parfois une odeur aigrelette. Le bacille pousse dans le *lait*, sans modifier visiblement ce milieu. Il croît également *en l'absence de l'air*, *dans le milieu T* (cité plus haut) ; en *gélose Veillon*, les colonies sont punctiformes. Parmi les *sucres*, il attaque glucose, lévulose, mais non pas saccharose, lactose, maltose, mannite. Les cultures sont insolubles dans la bile et ne renferment pas d'indol.

Leur *vitalité* est remarquable : en ampoules scellées de bouillon Martin-ascite, elles demeurent vivantes à la glacière pendant au moins dix mois.

Des cultures de 24 heures en bouillon Martin et milieu T ont été inoculées aux espèces suivantes : souris, pigeon, lapin, cobaye. Les *souris blanches* (mâles de 15 à 20 gr.), injectées sous la peau, succombaient, à l'origine, après inoculation d'une dose minimum de 1/100 de cent. cube, le temps de survie variant entre deux jours et demi et 15 jours suivant les animaux et les doses injectées. Le pouvoir pathogène a baissé depuis lors, légèrement d'ailleurs. Les souris destinées à succomber demeurent immobiles, somnolentes, le poil hérissé, les paupières agglutinées par la secrétion conjonctivale. A l'autopsie, la rate est souvent très grosse, parfois marbrée, ainsi que le foie ; les reins sont d'un rouge sombre, la face profonde de la peau fortement rosée. L'examen microscopique montre des microbes souvent très nombreux dans la rate et l'exsudat

sous-cutané au lieu d'inoculation, peu nombreux dans le rein et le sang du cœur ; l'ensemencement du cerveau fournit toujours des cultures positives.

Un *pigeon* ayant reçu dans le muscle pectoral 1 cent. cube de culture est mort au quatorzième jour. L'autopsie a montré une émaciation très accusée. Bacilles rares à l'examen direct de la rate et du foie, organes dont l'aspect macroscopique était normal, et décelés dans le sang du cœur exclusivement par la culture. Pas de lésions appréciables au niveau de la région inoculée.

Les *lapins* de (1 1/2 à 2 kilos) ont résisté à l'injection intramusculaire (1 cent. cube de culture), mais succombé aux inoculations intraveineuse et sous-cutanée (mêmes doses). La mort survient généralement en deux jours environ, exceptionnellement en quinze jours. On note, outre l'amaigrissement, un léger empâtement *loco læso* (dans les cas d'injection sous-cutanée). Le foie présente souvent un aspect granité avec de petites zones nécrotiques blanchâtres. En examinant les coupes, on trouve des îlots de nécrose juxta-portaux ; leur périphérie contient des cellules hépatiques en voie de destruction ; leur centre, des noyaux cellulaires eux-mêmes émiettés et un nombre considérable de bacilles. La rate peut être très grosse et présente également des îlots nécrotiques. Les bacilles se rencontrent à l'examen direct de la rate et du foie, quand la mort n'est pas trop tardive, particulièrement abondants par places ; de même dans les frottis de moelle osseuse, on les trouve rangés en paquets denses, extra ou intracellulaires; ils sont moins nombreux dans le sang du cœur. Les ensemencements du foie, de la rate, du sang du cœur, de la moelle osseuse ont été généralement positifs.

Un *cobaye* a résisté à l'inoculation sous-cutanée de 1 cent. cube de culture, n'ayant présenté qu'un empâtement local éphémère.

L'énoncé de ces différents caractères, morphologiques, culturaux, biologiques, pathogènes, montre la grande ressemblance de notre germe avec les microbes appartenant au groupe de *bacille du rouget*. Ne retrouvons-nous pas chez le bacille de ce méningitique la taille, la forme, l'aspect général du bacille du rouget, l'immobilité, l'asporogénie, le caractère Gram-positif,

l'aspect des cultures en bouillon et en gélatine, sur gélose, l'absence de pouvoir protéolytique et de production d'indol, le pouvoir pathogène vis-à-vis de la souris, du pigeon, du lapin, enfin l'absence de virulence pour le cobaye? Il est bien probable qu'un observateur non averti de l'origine spéciale de notre microbe ferait le diagnostic de bacille du groupe « rouget » et ne le distinguerait pas des échantillons isolés chez les porcs malades.

Il eût été désirable de compléter l'identification par l'étude des pouvoirs agglutinant et préventif du sérum « anti-rouget » vis-à-vis de notre microbe. Aussi avons-nous recherché ces deux propriétés. Mais, d'une part, ce germe se montre aussi agglutinable par le sérum équin normal que par le sérum « anti-rouget » ; d'autre part, l'injection sous la peau des souris de 1/10 de cent. cube de sérum « anti-rouget », pratiquée la veille, n'empêche pas régulièrement la mort des animaux ayant reçu sous la peau 100 doses mortelles de nos cultures, le lendemain ; au lieu que le même sérum protège facilement la souris contre 200 à 10.000 doses mortelles de divers échantillons de bacille du rouget isolés chez les porcs. Remarquons d'ailleurs que le pouvoir pathogène peu marqué de notre microbe nous obligeait à éprouver les souris avec de grosses masses (1 cent. cube) de cultures ; aussi est-il difficile de conclure avec sûreté touchant l'action exercée sur ce germe par le sérum « anti-rouget ».

La présence d'un pareil germe dans le liquide céphalo-rachidien d'un méningitique est vraiment insolite et surprenante. Le fait de l'avoir rencontré deux fois de suite à l'examen microscopique direct du liquide purulent exclut — est-il besoin de faire cette remarque? — tout soupçon de contamination accidentelle du produit pathologique analysé. Quel a été le rôle de cette bactérie dans la genèse de l'infection méningée à laquelle succomba notre malade? Ne fut-ce qu'un agent d'infection secondaire? Quels furent sa porte d'entrée dans l'organisme, son point de départ? Gorge, tube digestif? Autant d'inconnues qu'éclaircira peut-être l'étude ultérieure de cas semblables.

La singularité de cette observation autorise quelques remarques. Le rôle pathogène chez l'homme du bacille du rouget paraît restreint et, très particulières sont les circonstances,

dans lesquelles on a noté son ingérence. Il s'agit presque toujours, surtout en Allemagne, de bouchers, charcutiers, employés d'abattoir, ayant manipulé des viandes de porcs infectés, de vétérinaires s'inoculant par accident des cultures destinées à la vaccination. Le tableau clinique varie peu : lymphangite de la main ou de tout le membre supérieur, généralement curable, bien rarement mortelle. En Allemagne, les observations sont assez nombreuses et loin d'être toutes publiées (Mayer, Hildebrand, Casper, Schmuck, Hennig, Preisz, Rosenbach, Gerdes, Wetzel, Römer, Spitzer, etc.). En France, où la consommation de la viande de porc est moins abondante, les cas sont plus rares. L'un de nous a publié son auto-observation, avec photographie de la lésion ; la lymphangite résultait de l'inoculation accidentelle d'une culture ; Sabrazès et Muratet ont fait connaître un cas analogue.

En dehors des observations de rouget humain dont l'origine est indiscutable, signalons l'affection décrite en Allemagne depuis 1884 par Rosenbach sous le nom d'*érysipéloïde* (érysipèle chronique, pseudo-érysipèle, erythema nigrans). Il a reproduit cette lésion par inoculation d'un microbe spécial (1886), retrouvé plus tard dans les coupes de tissus (Ohlemann), et a pu assimiler l'érysipéloïde aux lésions résultant de l'inoculation accidentelle de bacille du rouget à l'homme, décrivant comme parents proches les trois bacilles du rouget, de l'érysipéloïde et de la septicémie des souris.

Chez l'homme, en dehors des observations précédentes, nous ne connaissons que le cas curieux de Lubowski, qui a réussi à isoler le bacille du rouget dans les selles d'un enfant atteint de catarrhe intestinal et d'ictère. Des investigations systématiques amèneraient peut-être à trouver plus souvent ce microbe. Poehl dit l'avoir rencontré dans des cultures de selles humaines en 1891, à Rotterdam, pendant l'épidémie de choléra et soupçonne son rôle étiologique dans certains cas d'endocardite humaine.

Kruse a isolé du pus d'un abcès frontal chez un syphilitique, à l'état pur, un bacille immobile, Gram positif, de morphologie semblable à celle du *B. mutisepticus*, mais sa description est trop sommaire, et l'aspect des cultures en gélatine, l'absence

de pouvoir pathogène pour la souris rendent incertain le diagnostic de bacille du groupe « rouget ».

Pour ne parler que des microbes appartenant certainement à ce groupe, tels que le *B. mutisepticus* (bacille de la septicémie des souris), on reconnaît aujourd'hui leur grande ubiquité. A l'exemples d'autres espèces bactériennes (streptocoques, pneumocoques, staphylocoques, etc.), décrites primitivement comme les agents spécifiques étiologiques de certaines affections, le bacille du rouget a d'abord été considéré comme l'agent du rouget du porc, maladie d'ailleurs polymorphe, aiguë (septicémie, exanthème) ou chronique (endocardites, arthrites), suivant les cas. Plus tard, différents auteurs ont rencontré des germes plus ou moins semblables dans les produits les plus divers, ainsi que le note Poehl : eau de rivière, excréments du porc et du bœuf, viande pourrie, cadavres de souris et de hamsters, entérite de la poule, selles humaines, érysipéloïde (Rosenbach), polyarthrite du mouton (Poehl), maladie de la poule (Broll), maladie des pigeons et des canards, rate des bovidés (Broll, Schipp), métrite septique de la vache, exsudat diphtérique d'oiseaux, infection septicémique des agneaux (Christiansen), etc. La constatation de la présence de bacilles du rouget dans les amygdales de porcs indemnes de la maladie doit être également signalée.

Aussi l'observation de notre méningitique, tout en constituant, à notre connaissance, un fait unique chez l'homme, n'est pas dépourvue de toute liaison avec certains faits déjà connus. Nous avons cru intéressant de rapprocher ici les faits en question. L'attention des observateurs étant attirée sur la présence du bacille du rouget chez différentes espèces animales, son rôle chez l'homme apparaîtra peut-être plus important que jusqu'à ce jour.

BIBLIOGRAPHIE

KRUSE, Die Mikroorganismen. *Traité de C. Flügge*, 3e éd., 1896, 2e vol., p. 447.

LUBOWSKI, Bacilles du rouget trouvés dans les selles d'un garçon atteint d'ictère. *Deut. med. Woch.*, 1901.

ROSENBACH, Etudes expérimentales, morphologiques et cliniques sur les microbes causant le rouget, l'érysipéloïde et la septicémie des souris. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1909, **63**, p. 343.

BROLL, Sur la présence de bactéries analogues au bacille du rouget chez le bœuf et la poule. *Berl. tier. Woch.*, 19 janvier 1911; analysé dans *Bull. Institut Pasteur*, 1911, p. 359.

POEHL, Rouget des pigeons et des canards, et variétés de bacilles du rouget suivant l'origine. *Folia Microbiologica*, 5, p. 1, décembre 1917.

COTONI, Etude sur le bacille du rouget. Ces *Annales*, sept. 1919, p. 634.

CHRISTIANSEN, Infection septicémique à bacille du rouget chez des agneaux, *Maaneds. for Dyrlaeger*, **31**, 1919; analysé dans *Bull. Institut Pasteur*, 1920, p. 485.

SABRAZÈS et MURATET, Rouget du porc chez l'homme. *Gaz. hebd. des Sc. méd. de Bordeaux*, 11 juillet 1920 et *Soc. Biol.*, 6 juillet 1920.

CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES CAUSES DE LA FORMATION DES BACTÉROÏDES CHEZ LES BACTÉRIES DES LÉGUMINEUSES

par Chr. BARTHEL.

(Travail du laboratoire bactériologique de la station centrale d'essais agricoles à Experimentalfältet, près Stockholm.)

Les recherches qui vont être relatées dans ce travail constituent une partie d'une série d'études sur la morphologie et la biologie du *Bact. radicicola* qui, depuis plusieurs années, ont été poursuivies au laboratoire bactériologique de la station centrale d'essais agricoles à Experimentalfältet, à côté du travail continuel de la fabrication de cultures de bactéries pour l'inoculation de différentes légumineuses dans la pratique agricole.

Une de ces études, qui s'occupe spécialement d'un détail morphologique desdites bactéries, à savoir le nombre et la disposition des cils, a déjà été publiée d'autre part (1).

En ce qui concerne les bactéroïdes, c'est un fait bien connu que ceux-ci se forment après que le *Bact. radicicola* qui, à l'état libre dans le sol, se trouve sous la forme de courts bâtonnets, s'est introduit dans les poils radiculaires des légumineuses, où il se fixe dans les cellules corticales. Ceci provoque une irritation des tissus avec une forte multiplication des cellules parenchymateuses, d'où s'ensuivent les nodosités bien connues. A l'intérieur de ces nodosités, les bactéries sont transformées en bactéroïdes, et ce n'est que lorsque cette transformation s'est produite que la symbiose entre la légumineuse et le *Bact. radicicola* commence à se faire sentir. On trouve quelquefois des tubercules qui ne contiennent que des bâtonnets ordi-

(1) Chr. Barthel, Die Geisseln des *Bacterium radicicola* (Beij). *Zeitschr. f. Gärungsphysiologie*, **6**, 1917, p. 13.

naires, mais ces tubercules sont alors sans importance pour l'assimilation de l'azote par la légumineuse.

Vu que la formation des bactéroïdes se trouve ainsi intimement liée à l'assimilation de l'azote atmosphérique par les légumineuses, il est bien naturel que la connaissance des facteurs qui peuvent influer sur la transformation des bâtonnets en bactéroïdes, soit d'un très grand intérêt et qu'ils valent bien d'être étudiés de plus près.

Si l'on consulte la littérature sur cette question, on trouve un grand nombre de données, mais qui très souvent sont contradictoires. Dans son travail : *Beiträge zur Morphologie und Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen*, Zipfel (1) a fait un résumé assez complet de cette littérature, auquel nous nous bornons ici à renvoyer les intéressés.

Zipfel prétend que toutes les observations antérieures sur la formation des bactéroïdes sur des substrats artificiels sont de nature fort subjective et peuvent être expliquées de la manière suivante : Les expérimentateurs qui ont observé des bactéroïdes dans des cultures fraîchement isolées des nodosités de légumineuses n'ont vu autre chose que les bactéroïdes provenant directement de celles-ci. Les formes ramifiées, d'autre part, qui ont été observées dans de vieilles cultures, doivent être considérées comme de vraies formes d'involution, telles qu'elles sont produites aussi par d'autres bactéries sous l'influence de conditions extérieures défavorables. Ces formes n'ont pourtant rien de commun avec les vraies bactéroïdes qui sont, au contraire, des formes normales de développement du *Bact. radicicola.*

A cette manière d'expliquer les choses, il faut encore ajouter que plusieurs observateurs, par le terme « bactéroïdes », n'entendent pas seulement les formes en Y ou distinctement ramifiées, mais aussi des formes autres que les bâtonnets ordinaires, telles que de bâtonnets élargis et gonflés, présentant souvent l'aspect de massues et même de sphères plus ou moins régulières. Il est absolument impossible de se former une idée précise sur ce sujet en étudiant l'ancienne littérature en question, d'autant plus qu'on n'y trouve que très peu de documents

(1) *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. II, **32**, p. 97, 1912.

objectifs, sous forme de microphotogrammes. Les microphotogrammes publiées en 1900 par Stutzer (1) et représentant des bactéroïdes de *Vicia Faba*, obtenus en cultivant les bâtonnets isolés de cette légumineuse sur des milieux liquides additionnés d'acides organiques divers (à la dose de 0,5 — I,0 gr. par litre), tels que l'acide succinique, maléique, tartrique et lactique, ne donnent point l'impression de vrais bactéroïdes, à l'exception, naturellement, de ceux représentant des formes provenant directement des tubercules. Il s'agit plutôt ici de véritables formes d'involution et Stutzer (2) dit lui-même plus tard, au sujet de ce travail : « Zweifellos sind in den damals von mir benutzten sauren Nährmedien Bakteroiden gebildet, aber zum Teil trugen diese den Charakter der Degeneration. » Il ne faut donc plus ajouter trop d'importance à ses anciens résultats.

En procédant de la manière préconisée par Stutzer, je n'ai jamais réussi à obtenir des bactéroïdes. Mazé (3), qui a fait des recherches très approfondies sur la biologie du *Bact. radicicola*, prétend que les ramifications du bacille qui se forment à l'intérieur des nodosités sont causées par les sucs acides qui circulent dans les racines. Hiltner (4), qui s'est voué à ces études, expose une masse de faits sur la formation des bactéroïdes en milieux artificiels, mais il est très difficile de tirer de là des conclusions précises. Nous reviendrons du reste plus tard sur un de ces faits.

Ni Zipfel (5), ni moi n'ont jamais réussi à obtenir de vrais bactéroïdes sur des milieux artificiels très variés, solides ou liquides, alcalins ou acides, tenus à des températures ordinaires. Partout il n'a été trouvé que des formes de bâtonnets simples. Zipfel a aussi systématiquement essayé un très grand nombre de substances au sujet de leur influence sur la formation des bactéroïdes, en procédant de la façon suivante : La substance en question était dissoute dans de l'eau ou bien, si elle n'était point soluble, on la broyait avec de l'eau, en ajou-

(1) *Mitteil. des landw. Instituts der königl. Universität Breslau*, 1900, fasc. 3, p. 57.
(2) *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. II, **7**, 1901, p. 910.
(3) Ces *Annales*, **10**, 1896, p. 287; **12**, 1898, p. 1, 128; **13**, 1899, p. 145.
(4) Lafar, *Handbuch der technischen Mykologie*, **3**, p. 51.
(5) *Loc. cit.*

tant quelquefois un peu de gomme arabique. Cela fait, on l'ajouta à de la gélose ou à de la gélatine à base de légumineuse, en proportions diverses. Zipfel trouva, ainsi que des acides organiques, tels que l'acide tartrique, maléique et succinique, des préparations protéiques telles que plasmone, tropone, roborate, sanatogène et nutrose, des hydrates de carbone comme dextrose et saccharose, des alcools supérieurs, tels que mannite, étaient tous sans action. Partout il n'a été trouvé que des bâtonnets ordinaires. Il examina aussi des substances qui se forment pendant la transformation des matières albuminoïdes, telles que des acides aminés (leucine, tyrosine, asparagine), ainsi que des composés nucléiques, mais sans plus de succès. Finalement il a aussi étudié l'influence des composés puriques (caféine, théobromine, théophylline, acide uréique, guanine, guanidine). De ces composés, *la caféine* seule donnait des résultats positifs à la dose de 0,1, 0,2, 0,3 et 0,4 p. 100. Les bactéroïdes étaient les plus nombreux avec une teneur en caféine de 0,3 p. 100; à la dose de 0,5 p. 100 de caféine, toute végétation était arrêtée. Si l'on ajoutait des matières protéiques (5 p. 100 de sanatogène ou de roborate) en même temps que la caféine, il n'y avait pas de développement des bactéroïdes.

Zipfel n'a pas pu cultiver les bactéroïdes par des inoculations répétées sur un milieu contenant 0,3 p. 100 de caféine. En transplantant les cultures caféinisées sur de la gélose ordinaire à extrait de légumineuses, il obtenait de nouveau des bâtonnets ordinaires. Les recherches de Zipfel sont très intéressantes et elles nous ont donné l'idée de poursuivre ces expériences en vue de chercher quelque explication générale quant à la cause de la formation des bactéroïdes dans les nodosités des légumineuses.

* * *

Dans nos expériences, nous avons cherché à démontrer l'influence sur la formation des bactéroïdes d'un certain nombre d'alcaloïdes végétaux, ce terme étant pris dans le sens étendu du mot, c'est-à-dire qu'on y comprend tous les produits végétaux exerçant une fonction basique prononcée, nonobstant la place de ces composés dans le système chimique. Nous avons essayé les corps suivants : *la caféine*, *la guanine*,

la guanidine, *la pyridine* et *la chinoline*. Les trois premiers ont déjà été employés dans les expériences de Zipfel ; la guanine et la guanidine avec des résultats négatifs.

Les cinq composés énumérés ci-dessus sont tous des alcaloïdes, quoiqu'ils aient une composition chimique très différente. La caféine et la guanine appartiennent au groupe purique, la guanidine est de l'urée imidée. Les deux derniers composés se trouvent dans les légumineuses. La pyridine et la chinoline sont toutes deux des corps hétérocycliques, chez lesquels l'azote entre comme un chaînon dans un anneau fermé (alcaloïdes spécifiques), et toutes les deux forment les noyaux d'un très grand nombre d'alcaloïdes végétaux, dont plusieurs entrent aussi dans la composition des légumineuses.

Comme milieu de culture nous nous sommes servi d'une gélatine à extrait de lupins, ayant la composition suivante :

Eau	900 grammes
Gélatine	100 —
Saccharose	5 —
Extrait de germes de lupins (1)	2 c.c. 5

A ce milieu, qui avait une réaction légèrement acide, était ajouté 0,1, 0,3 et 0,5 p. 100, respectivement, des substances à essayer. Pour les différentes adjonctions on procédait de la manière suivante :

Caféine : 0 gr. 05, 0 gr. 15 et 0 gr. 25 étaient broyés avec 1 cent. cube d'eau et 0 c. c. 25 d'une solution de gomme arabique et ajoutés ensuite à 49 cent. cubes de gélatine de lupin.

Guanine : Même traitement que pour la caféine,

Guanidine : 0 gr. 45 étaient dissous dans 9 cent. cubes d'eau, et de cette solution on prenait 1 c. c. 3 et 5 cent. cubes qu'on ajoutait à 49, 47 et 45 cent. cubes de gélatine. La gélatine était ensuite légèrement acidifiée par de l'acide tartrique.

Pyridine : Traitement comme pour la guanidine, moins l'acidification par l'acide tartrique.

Chinoline : 0 gr. 45 sont dissous dans 9 cent. cubes d'alcool, dont on prélevait 1 c. c. 3 et 5 cent. cubes pour 50 cent. cubes de gélatine. (L'alcool est chassé à la stérilisation.)

Les milieux ainsi préparés étaient ensuite introduits dans des tubes stérilisés, 10 cent. cubes dans chacun, et soumis à la stérilisation fractionnée. Trois tubes de chaque milieu et de

(1) Les germes étaient broyés et digérés avec le même volume d'eau à 60°.

chaque concentration étaient inoculés avec *Bact. radicicola* en strie. La culture employée pour les inoculations était isolée de la vesce depuis plus de deux ans et l'âge de la culture employée pour l'inoculation était toujours de deux jours.

Toutes les cultures étaient gardées à la température du laboratoire. Après sept jours, elles étaient examinées macroscopiquement et microscopiquement. Pour l'examen microscopique, les préparations étaient colorées soit à la fuchsine, soit au violet de gentiane, solution de Lugol et d'alcool amylique, selon la modification de Kiskalt.

Les résultats étaient les suivants :

Caféine 0,1 p. 100 : Végétation visqueuse, normale et forte. Coulée jusqu'au bout du tube. *Au microscope* : Des masses de bactéroïdes typiques.

Caféine 0,3 p. 100 : Végétation apparente, mais moins forte qu'avec 0,1 p. 100. *Au microscope* : Les bactéroïdes sont à peu près aussi nombreux que les bâtonnets et présentent des formes très typiques (voir la planche, fig. 1).

Caféine 0,5 p. 100 : Végétation faible. Seulement une trace d'une goutte à la fin de la strie. *Au microscope* : Point de bactéroïdes ; seulement des bâtonnets.

Guanine : Aux trois concentrations la végétation était aussi forte que sur la gélatine de lupins ordinaire. *Au microscope* : A toutes les concentrations on ne trouve que des bâtonnets.

Guanidine 0,1 p. 100 : Végétation aussi forte que sur la gélatine de lupins ordinaire. *Au microscope* : Bâtonnets ; point de bactéroïdes.

Guanidine 0,3 p. 100 : Végétation faible, à peine perceptible. *Au microscope* : Des bactéroïdes assez nombreux, à toutes les phases de développement.

Guanidine 0,5 p. 100 : Végétation à peine perceptible. *Au microscope* : Bâtonnets petits et dégénérés ; point de bactéroïdes.

Pyridine 0,1 p. 100 : Végétation forte et coulant lentement jusqu'au fond du tube. *Au microscope* : Bâtonnets normaux ; point de bactéroïdes.

Pyridine 0,3 p. 100 : Végétation moins forte que chez la précédente, mais pourtant bien visible. *Au microscope* : Quelques bactéroïdes isolés bien rares.

Pyridine 0,5 p. 100 : Végétation comme avec 0,3 p. 100. *Au microscope* : Les bactéroïdes ne sont pas trop rares. On trouve des formes typiques en Y, ainsi que des bâtonnets renflés et avec un commencement d'incision en forme de Y.

Chinoline 0,1 p. 100 : Végétation faible mais pourtant bien visible. *Au microscope* : Bactéroïdes isolés. Pour la plupart sous forme d'un Y court et trapu.

Chinoline 0,3 p. 100 : Végétation comme chez la précédente. *Au microscope* : Les bactéroïdes sont extrêmement rares. Dans plusieurs champs microscopiques on n'en trouve aucun.

Chinoline 0,5 p. 100 : Végétation comme avant. *Au microscope* : Point de bactéroïdes.

Ces expériences ont donc démontré que parmi les cinq substances qui ont été examinées au point de vue de leur faculté de provoquer la formation de bactéroïdes, il y en a au moins

quatre qui possèdent cette faculté, quoique à un degré très différent.

La caféine occupe ici la toute première place. A une concentration qui n'excède point la limite permettant le développement de la culture, cet alcaloïde amène promptement et invariablement la formation d'une quantité de bactéroïdes bien développés et caractéristiques. La guanine n'a pas du tout cette qualité, tandis que la guanidine, la pyridine et la chinoline, en quantités convenables, causent aussi la formation de bactéroïdes, quoiqu'elles n'atteignent pas le même pouvoir sous ce rapport que la caféine.

Une culture de *Bact. radicicola*, isolée de pois, donnait sur de la gélatine de lupins additionnée de 0,3 p. 100 de caféine presque exclusivement des bactéroïdes, le plus souvent aux formes richement ramifiées, ressemblant à des lettres chinoises (voir la planche, fig. 2).

Les bactéroïdes obtenus sur de la gélatine caféinisée, avec le *Bact. radicicola* provenant soit de la vesce, soit du pois, se transformèrent toujours immédiatement en bâtonnets ordinaires quand on les transplanta sur de la gélatine de lupins non additionnée de caféine. De nouveau reportés sur la gélatine caféinisée, les bactéroïdes paraissaient promptement.

On peut renouveler cet essai aussi souvent que l'on veut; le résultat reste toujours le même. Zipfel fait aussi cette observation, mais, par contre, il n'a point réussi à obtenir, par des passages successifs sur gélatine caféinisée, de nouvelles cultures contenant des bactéroïdes. Bien plus, il n'a obtenu aucune végétation à partir du premier passage, quoiqu'il ait cherché à acclimater les bactéries à la caféine par des cultures répétées sur de la gélatine contenant cette substance en quantités chaque fois augmentées. Pour expliquer ces faits, Zipfel émet l'hypothèse, purement téléologique, que « ce n'est point étonnant que les bactéroïdes ne se laissent pas cultiver comme telles, en dehors de la première culture, lorsqu'on continue à les cultiver sur le même milieu où elles se sont formées la première fois, vu que le rôle des bâtonnets dans les nodosités est rempli avec leur transformation en bactéroïdes ».

Comme ce raisonnement nous a paru un peu étrange, nous avons fait des études spéciales afin d'éclaircir ce point-là.

Une culture de *Bact. radicicola* de la vesce sur gélatine de lupins + 0,3 p. 100 de caféine contenant des masses de bactéroïdes était réinoculée sur deux tubes de gélatine de la même composition. Après quatre jours les deux cultures étaient examinées. Dans l'une il y avait une trace de végétation, dans l'autre rien du tout. Au microscope, le tube contenant une trace de végétation montra des bactéroïdes aussi nombreux et aussi bien développés que dans la culture originale.

Un deuxième passage ne donna plus de végétation du tout après six jours. Au microscope on observait des bâtonnets isolés et de rares bactéroïdes, mais l'un et l'autre étaient pâles et mal colorés. Ces cellules provenaient probablement de l'ensemencement.

Ces résultats paraissent donc s'accorder assez bien avec ceux de Zipfel. J'ai pourtant fait un nouvel essai, et cette fois avec une culture des bactéries du pois. Ces bactéries sont, comme l'on se souvient, particulièrement sensibles à l'influence de la caféine.

Au premier passage de ces bactéries sur gélatine caféinisée, on obtenait après six jours une faible végétation, qui pourtant était assez forte pour permettre la formation d'une goutte au bout de la strie.

Au microscope on voyait presque exclusivement des bactéroïdes très bien développés et richement ramifiés (voir la planche, fig. 3). Réensemencée sur le même milieu, cette culture donnait de nouveau une végétation faible, mais bien distincte et l'examen microscopique montra les mêmes bactéroïdes typiques que dans la culture précédente (voir la planche, fig. 4).

Cette fois-ci j'avais donc réussi à obtenir des bactéroïdes typiques dans trois cultures successives. Et ici il est complètement exclu qu'on puisse parler d'un simple transport des bactéroïdes d'une culture dans une autre.

Si l'on choisit une concentration de caféine au-dessous de 0,3 p. 100, de sorte que la végétation même n'est pas si fortement arrêtée par cette substance, on peut continuer plus longtemps avec les réensemencements. On peut aussi arriver à des résultats analogues avec des bactéroïdes de la vesce. Il n'y a aucune raison pour qu'on n'obtienne pas des bactéroïdes avec

d'autres origines, puisque la caféine une fois pour toutes exerce cet effet spécial sur le *Bact. radicicola.*

Il est très difficile d'expliquer la cause de cette influence remarquable. Gamaleia, qui a étudié l'influence de la caféine sur différentes bactéries, a émis l'hypothèse qu'il s'agit ici d'une action sur les corps nucléiques de la cellule. C'était justement à cause des travaux de Gamaleia que Zipfel était amené à faire ses recherches sur ce sujet.

Revenons encore à nos expériences sur l'action de différents alcaloïdes sur la formation de bactéroïdes. Nous avons déjà vu que parmi les cinq corps examinés à ce point de vue, il n'y en avait qu'un seul, la guanine, qui donnait un résultat tout à fait négatif, tandis que la caféine agissait toujours d'une façon très forte et les autres exerçaient une action positive, quoique moins prononcée que la caféine.

On pouvait admettre que la concentration en ions hydrogène du milieu de culture jouerait aussi un certain rôle dans ces essais, puisque le milieu en lui-même, c'est-à-dire la gélatine de lupins, acquiert, par les différentes adjonctions, une acidité « réelle ». J'ai donc déterminé, au moyen de la méthode électrométrique, la concentration en ions hydrogène des différents milieux, et les résultats de ces déterminations sont exposés dans le tableau ci-dessous.

GÉLATINE DE LUPINS additionnée de	CONCENTRATION p. 100	p_H	OSERVATIONS
Caféine	0,1	5,95	p_H original de la gélatine de lupins = 6,40.
	0,3	5,68	
	0,5	5,43	
Guanine	0,1	5,89	
	0,3	5,97	
	0,5	5,93	
Guanidine	0,1	5,87	
	0,3	6,53	
	0,5	6,74	
Pyridine	0,1	6,02	
	0,3	5,96	
	0,5	6,02	
Chinoline	0,1	5,93	
	0,3	5,94	
	0,5	6,01	

Ce tableau démontre clairement que la formation des bactéroïdes n'est aucunement en rapport direct avec la concentration du milieu en ions hydrogène. Regardons par exemple le cas de la caféine et de la guanine. Les p_H sont ici presque les mêmes pour 0,1 p. 100 de caféine et pour 0,3 et 0,5 p. 100 de guanine. Il y avait dans les deux cas une végétation normale, mais, tandis que la caféine provoquait un développement abondant de bactéroïdes, la guanine était absolument sans action. La pyridine à la dose de 0,5 p. 100, la chinoline à 0,1 p. 100 et la guanidine à 0,3 p. 100 provoquent toutes une formation de bactéroïdes à peu près de la même intensité, quoique les valeurs respectives de p_H soient de 6,02, 5,93 et 6,53.

Nulle part la concentration en ions hydrogène n'est assez grande pour pouvoir entraver le développement même des cultures, car les valeurs « critiques » de p_H pour ces bactéries sont beaucoup inférieures à celles de nos milieux (1).

Les cultures de bactéries des légumineuses, fabriquées dans notre laboratoire pour l'usage des agriculteurs, sont cultivées sur terre stérilisée, additionnée seulement de 3 p. 100 de chaux sous forme de $CaCO_3$. Cette méthode, inaugurée par J. Simon à Dresde, donne d'excellents résultats. Déjà après deux jours, la terre stérilisée, inoculée avec quelques grains d'une culture précédente, est tout à fait envahie par les bactéries de sorte que, si l'on ensemence la surface d'un tube de gélatine de lupins avec quelques grains de cette terre inoculée, il se forme autour de chaque particule de terre une colonie de *Bact. radicicola.*

Dans ces cultures sur terre stérilisée et chaulée, on ne trouve jamais que de bâtonnets ordinaires (voir la planche, fig. 5). Il restait à voir si, dans ces cultures, l'action des alcaloïdes se manifesterait de la même façon que dans les cultures sur gélatine.

J'ai donc ajouté de la caféine à de la terre chaulée dans la même concentration (0,3 p. 100) qu'à de la gélatine. Seulement, quand il s'agit de la terre, il ne faut point calculer sur le poids de la terre même, car il est bien clair que la caféine

(1) E. B. Fred et A. Davenport. *Journ. of Agricultural Research.*, **14**, 1818, p. 317.

agit seulement dans la solution aqueuse qui entoure les particules de terre, de même que le développement des bactéries se fait aussi exclusivement dans ce liquide qui, dans notre terre stérilisée, constitue entre 15 et 20 p. 100 du poids total de la terre. Il faut donc ajouter la caféine à raison de 0,3 p. 100 de la teneur de la terre en eau.

Dans des cultures sur terre ainsi préparée et stérilisée, ensemencées avec des bactéries de la vesce et du pois, on trouvait, après quelques jours à la température du laboratoire, des bactéroïdes typiques à l'examen microscopique (1). La plupart des bactéries s'y trouvaient sous la forme de bâtonnets, mais on trouvait pourtant des bactéroïdes en forme d'Y dans presque tous les champs microscopiques de la préparation (voir la planche, fig. 6).

En ensemençant de nouveau sur de la terre caféinisée, on obtenait encore des bactéroïdes.

Puisque l'on peut arriver au même but, tout en se servant de deux substrats aussi différents l'un de l'autre que la gélatine de lupins et la terre stérilisée, il est évident que c'est à la caféine seule qu'il faut attribuer cette action spéciale de provoquer la formation des bactéroïdes. Il nous paraît pourtant vraisemblable que la gélatine à l'extrait de germes de lupins possède quelque action spéciale, non sur la formation même des bactéroïdes, mais sur le développement luxuriant de ces formes. Dans les cultures sur terre stérilisée, on ne trouve jamais de bactéroïdes aussi richement ramifiés que dans la gélatine de lupins, la dose de caféine étant la même dans ces deux milieux. Si l'on cultive les bactéries du pois sur de la gélatine ordinaire, additionnée de 0,3 p. 100 de caféine, on obtient une quantité de bactéroïdes, mais presque exclusivement des formes d'Y, sans ramifications secondaires. Nous avons essayé de faire apparaître des formes richement ramifiées dans de la terre stérilisée, en y ajoutant, à côté de la caféine, un extrait de

(1) En ce qui concerne l'examen microscopique des cultures de différents micro-organismes sur terre stérilisée, voir Chr. Barthel, Kulturen von Gärungsorganismen in sterilisierter Erde. *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. II, **49**, 1918, p. 340; et Chr. Barthel, Cultures de bactéries sur terre stérilisée, *Meddel. från K. Vetenskapsakademiens Nobelinstitut*, **5**, nº 20, 1919 (livre de jubilé de M. Svante Arrhenius). Le meilleur colorant pour ces préparations est le *rose bengale*, qui a été introduit dans ce but par H. J. Conn.

germes de lupins, mais nous n'avons toujours obtenu que des formes en Y.

Nous ne voulons point soutenir que ce soient uniquement les alcaloïdes du règne végétal qui soient doués du pouvoir de provoquer la formation de bactéroïdes. La même influence est exercée aussi par d'autres composés organiques contenant de l'azote. Ainsi, j'ai fait des expériences avec l'acide hippurique, composé de la glycine et de l'acide benzoïque, et qui se trouve dans l'urine des herbivores.

L'acide hippurique était mis en solution dans de l'eau bouillante et ajouté ensuite à de la gélatine de lupins dans les trois concentrations ordinaires. En ensemençant des bactéries de la vesce sur ce milieu, il se produisait une végétation très faible dans les tubes contenant 0,1 p. 100 d'acide hippurique et au microscope on trouvait là, parmi les bâtonnets ordinaires, des bactéroïdes isolés, mais à tous les degrés de développement typiques.

Il y a pourtant moins d'intérêt de constater que certains composés, qui ne se trouvent point dans les tissus des végétaux, sont aussi doués d'un certain pouvoir de provoquer la formation des bactéroïdes. Ce qui est essentiel, c'est la constatation que cette faculté appartient à nombre d'alcaloïdes végétaux qui se trouvent normalement dans les plantes légumineuses. La caféine, qui agit le plus fortement, ne se trouve point chez ces plantes, mais les autres alcaloïdes que nous venons d'examiner à ce point de vue s'y trouvent tous. On sait, de plus, que les légumineuses sont parmi les plantes les plus riches en alcaloïdes.

Ces alcaloïdes doivent évidemment se trouver aussi dans les racines des plantes, pour pouvoir exercer leur influeuce sur la formation des bactéroïdes. Pourtant, la littérature de physiologie végétale ne contient que fort peu de données sur ce point. Ainsi on trouve chez Czapek, dans sa *Biochemie der Pflanzen*, 2, p. 266, seulement cette observation (de Molle) que les racines de *Datura* sont riches en alcaloïdes à l'état jeune, et l'on sait aussi, par exemple, que l'alcaloïde *berbérine* se trouve surtout dans les racines de *Berberis* (à 1,3 p. 100).

Un fait qui parle aussi en faveur de la présence d'alcaloïdes dans les racines des légumineuses, est l'observation de

Hiltner (1) : il lui est arrivé, en cultivant le *Bact. radicicola* sur une gélatine à base d'extrait de légumineuses *et de leurs racines*, d'obtenir des bactéroïdes très bien développés.

CONCLUSIONS

Le fait trouvé par Zipfel, que la caféine possède la faculté de provoquer constamment la formation de bactéroïdes sur des milieux solides, a été confirmé par nos expériences.

Mais il résulte aussi de nos recherches que cette qualité appartient encore à d'autres alcaloïdes végétaux de composition très différente. Ainsi la *guanidine*, la *pyridine* et la *chinoline* agissent toutes de la même manière que la caféine, quoique moins fortement. Il est bien probable que d'autres alcaloïdes se comportent de même, ainsi que d'autres composés organiques azotés, tels que l'acide hippurique, par exemple.

Puisque ces alcaloïdes végétaux entrent toujours dans la composition des légumineuses, il nous semble bien probable que la formation normale de bactéroïdes dans les nodosités des légumineuses dépend plus ou moins de la présence des alcaloïdes dans les racines de ces plantes.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Bactéroïdes de *Bact. radicicola* cultivé de la vesce.
Fig. 2. — — — — du pois.
Fig. 3. — — — — du pois; deuxième passage.
Fig. 4. — — — — — troisième passage.

Toutes les cultures sont faites sur gélatine de lupins, à 0,3 p. 100 de caféine.

Fig. 5. — Culture sur terre stérilisée de *Bact. radicicola* de la vesce. Age de la culture : 40 jours.

Fig. 6. — Culture sur terre stérilisée additionnée de caféine, de *Bact. radicicola* du pois. Age de la culture : 9 jours. Bactéroïdes.

Grossissement partout 1.000 : 1.

Toutes les préparations sont colorées à la fuchsine, sauf figure 6, qui a été colorée par le rose bengale.

(1) *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. II, **6**, 1900, p. 273.

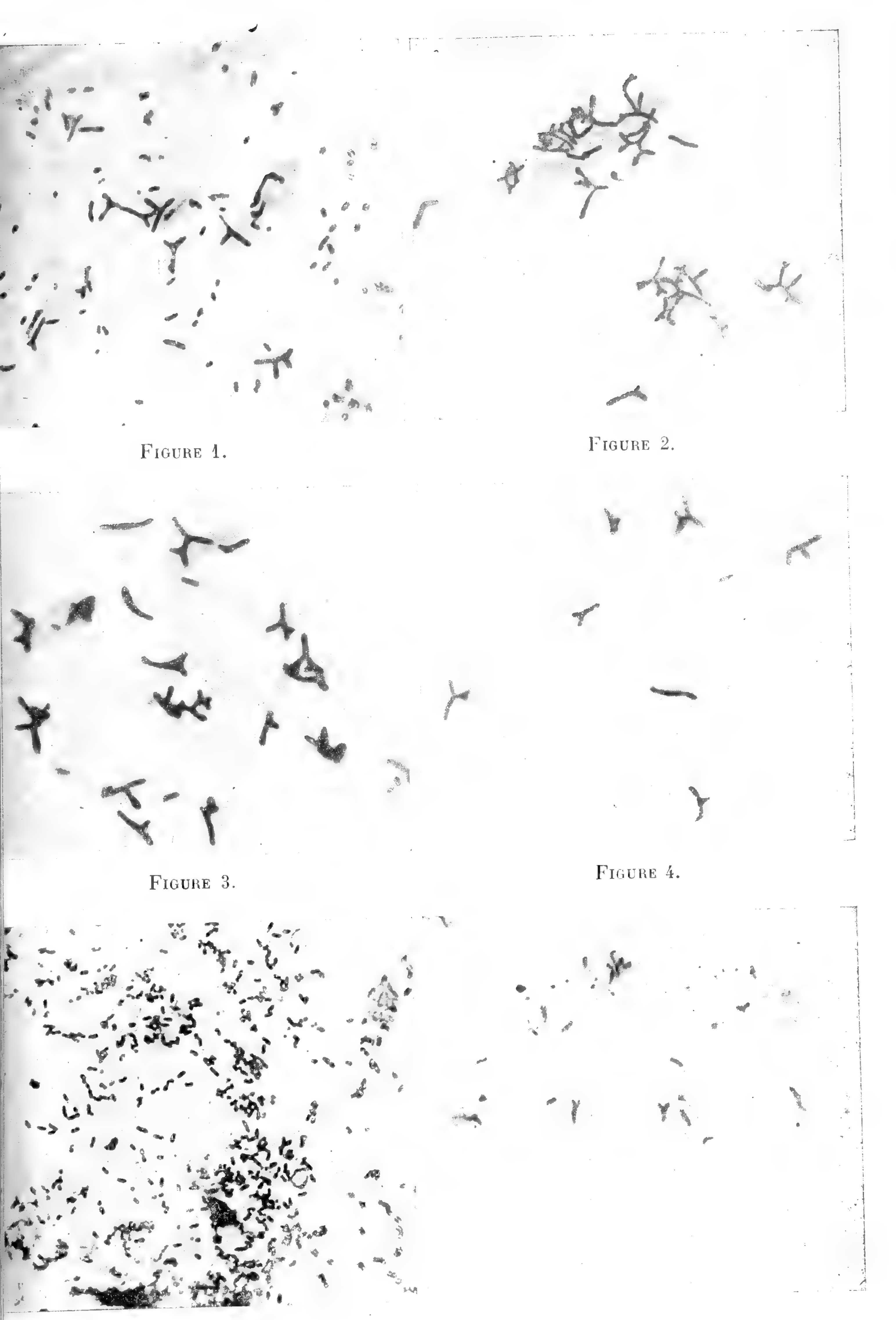


Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

RECHERCHES SUR LE ROLE DE LA GLOBULINE DANS LA RÉACTION DE WASSERMANN, AVEC UNE CONTRIBUTION A LA TECHNIQUE DE LA DIALYSE ET A L'EXÉCUTION DU WASSERMANN

par KAPSENBERG.

(*Suite.*)

C. — EXPÉRIENCES SUR LE ROLE DE LA GLOBULINE DANS LA RÉACTION DE WASSERMANN

Deux particularités de la réaction de Wassermann ont conduit à des recherches, se complétant réciproquement, à savoir sa complication et son caractère énigmatique. La première a donné naissance à des méthodes plus simples, que les auteurs ont imaginé de substituer à la réaction primitive; la seconde a stimulé les expérimentateurs à faire des expériences, afin de contrôler une idée préconçue concernant le principe du Wassermann. Tous ces efforts n'ont pas encore été couronnés d'un succès définitif jusqu'à présent.

Or l'explication de la réaction de Wassermann est probablement intimement liée à celle du phénomène découvert par Bordet et Gengou. En effet, si grande que soit la différence entre la fixation du complément par un bacille typhique en combinaison avec son propre sérum d'une part et celle produite par l'extrait alcoolique d'un organe et le sérum d'un syphilitique de l'autre, il est indiscutable que dans les deux cas c'est le complément qui disparaît du milieu ambiant, et cela grâce au concours de deux substances. L'analogie est-elle essentielle ou seulement apparente?

Il n'est pas encore permis de donner une réponse catégorique.

Pourtant, quoique la question ne soit pas encore résolue, on est en droit de comparer la réaction de Wassermann au

phénomène de Bordet et Gengou et de tâcher de les expliquer d'une même façon.

L'observation d'après laquelle le complément est dévié par une suspension de particules ou flocons plus ou moins petits a fait naître l'idée que le phénomène de Bordet et Gengou reposerait sur un processus similaire. Elle a pris une forme un peu plus précise dans la conception, que la fixation du complément serait, en général, la conséquence d'une agglomération ou précipitation invisible de colloïdes hydrophiles. Les particules, ayant une tendance à se précipiter, adsorberaient, pendant ou après leur naissance, le complément.

Or, il paraît qu'une telle interprétation a, en effet, jusqu'à un certain point sa raison d'être en ce qui concerne la réaction de Wassermann. Pour soutenir cette opinion, je rappelle les méthodes par lesquelles on démontrait, au moyen d'une précipitation visible, une différence entre le sérum d'un syphilitique et celui d'une personne normale. Je citerai la réaction de Porges et Meijer (1), qui se servaient de la lécithine ; celle de Klausner (2), dans laquelle un état trouble est provoqué par l'addition d'eau distillée; celle de Hermann et Perutz (3), qui déterminèrent la précipitation au moyen de glycocholate de soude et de cholestérine; et surtout la réaction de Meinicke (4) et de Sachs et Georgi (5), publiée en ces derniers temps, qui se servent de l'antigène, aussi employée dans la réaction de Wassermann.

Toutes ces réactions (6), bien qu'elles n'aient pas une spécifité aussi marquée que celle de Wassermann, et par là dépourvues d'application pratique, ont pourtant une signification scientifique essentielle. Elles ont fixé l'attention sur cette partie du sérum, qui se distingue par la facilité relative avec laquelle elle est précipitée ou fait naître des précipités, à savoir la globuline.

Se basant en grande partie sur des considérations hypothé-

(1) *Berl. klin. Woch.*, 1908, n° 15.
(2) *Wiener klin. Woch.*, 1908, n° 7.
(3) *Med. Klin.*, 1911, p. 60.
(4) *Berl. klin. Woch.*, 1918, n° 4 et *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, n° 27, fasc. 4.
(5) *Med. Klin.*, 1918.
(6) Celles de Meinicke, de Sachs et Georgi sont encore trop récentes pour permettre de les apprécier.

tiques, Elias, Neubauer, Porges et Salomon (1), ainsi que Sachs et Altmann (2), ont défendu l'opinion d'après laquelle la réaction de Wassermann aurait son explication dans une altération spéciale de la globuline.

Partant de ces données et d'autres, il me paraissait indiqué de rechercher auquel des éléments constitutifs principaux d'un sérum il fallait attribuer la réaction de Wassermann.

Lorsque j'ai commencé mes recherches, j'avais l'idée que des expériences semblables n'avaient pas encore été entreprises. Il m'a paru cependant qu'un petit nombre de travaux avaient été exécutés sur ce sujet, surtout en 1910 et 1911, donc peu de temps après la découverte et l'introduction de la réaction. Ils ont été faits par Landsteiner (3), Gross et Volk (4), Bauer et Hirsch (5), Friedemann (6) et Schmidt (7). Or, les résultats obtenus par ces différents auteurs sont souvent contradictoires entre eux et leurs expériences sont toutes incomplètes. Les recherches de ces auteurs n'ayant en rien influencé les miennes, je me contente de les citer.

Dans mes travaux personnels, je n'ai pas tenu compte de la question encore ouverte, concernant la pluralité des globulines, et je me suis placé au point de vue de Denis-Hammersten (8), c'est-à-dire envisageant l'unité de la globuline.

Je me suis donc posé les questions suivantes :

Quelle est la partie d'un sérum donnant un Wassermann positif, qui provoque l'entrée en scène de la réaction ?

Est-ce la globuline?

Est-ce l'albumine ?

Sont-elles toutes deux capables de donner séparément la réaction ou bien doivent-elles se compléter réciproquement?

Pour rechercher la réponse à ces questions, j'ai recherché sur plusieurs sérums positifs et sur plusieurs sérums négatifs le

(1) *Wiener klin. Woch.*, 1908, n° 21.
(2) *Berl. klin. Woch.*, 1908, n° 10.
(3) *Wiener klin. Woch.*, 1908, n° 29. Communication à la Société de Dermatologie viennoise.
(4) *Wiener klin. Woch.*, 1908, n° 18.
(5) *Wiener klin. Woch.*, 1910, n° 1.
(6) *Zeitschr. f. Hyg. und Inf.-Krankheiten*, **67**, 1910.
(7) *Zeitschr. f. Hyg. und Inf.-Krankheiten*, **69**, 1911.
(8) *Zeitsch. f. Phys. Chemie*, **8**.

résultat de la réaction de Wassermann exécutée, chaque fois et en même temps, avec le sérum complet, avec sa globuline seule et avec son albumine seule, plus ou moins complètement débarrassée de globuline.

L'on sait qu'on peut obtenir la globuline d'un sérum par diverses méthodes : par la dialyse, par l'introduction d'acide carbonique et au moyen des acides chlorhydrique ou acétique. Toutes ces méthodes ne fournissent cependant qu'une partie de la quantité totale de la globuline que contient un sérum. Pour obtenir toute cette globuline, il faut avoir recours aux méthodes, qui utilisent certains sels en solution très concentrée. Parmi ces dernières, la méthode de Denis-Hammersten ($MgSO_4$) (1) et celle de Kauder-Hofmeister (2) [$(AzH_4)_2SO_4$] sont d'une application courante.

J'ai commencé par étudier la globuline, qui se précipite d'un sérum en le dialysant, et l'albumine restante. J'élimine de cette façon les substances (sulfates de magnésium ou d'ammonium) qui pourraient influencer les résultats de Wassermann.

J'ai été conduit par les résultats obtenus en opérant avec la dialyse, à appliquer d'abord la méthode de Denis-Hammersten, puis celle de Kauder-Hofmeister.

Dans toutes ces expériences je me suis servi pour la dialyse et pour l'exécution du Wassermann de la technique que j'ai décrite dans la première et la deuxième partie de ce mémoire.

I. — Séparation de la globuline du sérum par la dialyse.

Je donne ici les protocoles un peu détaillés.

Protocole I. — Sérum Pae : Ponction veineuse le 10 avril 1918, après-midi. Chauffé le 11. Wassermann le 12 : positif. Sérum conservé à la glacière. Le 16, 2 c. c. 4 dans un dialyseur, plongé dans 100 cent. cubes d'eau distillée ; celle-ci chaque jour renouvelée, ne donnant jamais la réaction d'une substance albuminoïde, mais pourtant, les deux premiers jours, distinctement celle du sel marin. Le 18 : le volume du sérum s'accroît jusqu'à 5 cent. cubes, il est distinctement trouble. Le sérum est centrifugé et l'albumine est décantée du sédiment de globuline ; ces deux substances sont gardées à la glacière jusqu'au 19. Le liquide albumineux, rendu isotonique avec la quantité nécessaire de sel marin sec, est dilué ensuite avec du liquide physiologique jusqu'à

(1) *Loc. cit.*
(2) *Archiv. f. experimentelle Path. und Pharmacol.*, **20**, 1885.

12 cent. cubes (donc comme le sérum 1 : 5). La globuline est reprise dans 2 c. c. 4 de liquide physiologique ; la dissolution ne se faisant pas complètement, on ajoute une trace de KOH, qui provoque la dissolution presque complète. Après centrifugation le liquide clair est décanté et dilué jusqu'à 12 cent. cubes.

Résultat du Wassermann. — Aucune différence entre les trois réactions :

Sérum = positif;
Globuline = positif;
Albumine = positif;
Témoins et contrôles : sans faute.

PROTOCOLE II. — Les sérums suivants ont été examinés:

1. Pae., le même que dans le protocole précédent; le 22 avril 1918, 1 c. c. 2 dans le dialyseur, plongé dans 100 cent. cubes d'eau distillée, renouvelée journellement, ne donnant pas la réaction des substances albuminoïdes mais d'abord très distinctement celle du sel marin ; le 25, la globuline, séparée par centrifugation, et l'albumine conservées séparément à la glacière jusqu'au 26, date à laquelle le Wassermann fut exécuté.
2. Ke., ponction veineuse le 18 avril 1918, chauffé le 19. Le 22, 1 c. c. 2 dans le dialyseur, puis exactement comme pour Pae.
3. Meij-K., ponction veineuse le 22 avril 1918; non chauffé. Le 24, 1 c. c. 2 dans le dialyseur, puis comme pour Pae, seulement centrifugé le 26.
4. Aff., ponction veineuse le 24 avril 1918, non chauffé, puis comme pour Meij-K.
5. He., exactement comme pour Aff.
6. Ha., exactement comme pour Aff.

Le 26 avril 1918, le liquide albumineux est rendu isotonique et dilué jusqu'à 6 cent. cubes. L'albumine des différents sérums a attiré des quantités d'eau variables, Pae. s'élève jusqu'à 2 c. c. 6, Ke. à 2 cent. cubes, Meij-K. à 4 c. c. 8, Aff. à 2 c. c. 4, He. à 3 c. c. 8, Ha. à 4 c. c. 8. Les globulines furent dissoutes dans 1 c. c. 2 de liquide physiologique en ajoutant cinq petites anses de KOH (10 p. 100). Pour Pae. la dissolution ne fut pas complète, tandis qu'elle le fut pour les autres, bien que He. et Ha. n'aient eu qu'une anse de KOH. Diluées jusqu'à 6 cent. cubes. Les globulines des sérums non chauffés ne sont pas chauffées non plus. Les sérums furent chauffés pour le Wassermann.

Résultat : tableau VIII.

Pour tirer une conclusion de ces expériences, il faut d'abord écarter les globulines He. et Ha., qui se sont montrées tout à fait anticomplémentaires. J'y reviendrai tantôt. Or, il est évident que la globuline d'un sérum positif réagit comme le sérum complet, tandis que celle d'un sérum négatif, d'après la réaction de la globuline Ke., se comporte négativement. Très remarquable est surtout la conduite des albumines. Celles d'un sérum positif donnent un Wassermann positif, *quelquefois cependant (Pae., Meij-K.) d'une façon moins nettement*

TABLEAU VIII.

$p = 0,1 \quad q_1 = q = 0,2$

	NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT 0,2	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT 0,3	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT 0,2	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT 0.3	INTERPRÉTATION
CHAUFFÉ	Pae. Sérum.	H. presque compl.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globul.	H. complète.	»	»	»	»	Positif.
	— Album	»	H. nulle (partielle).	H. complète.	H. nulle (partielle)	H. complète.	Faiblement positif (douteux).
	Ke.. Sérum.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globul.	»	»	»	H. presque compl.	»	Négatif.
	— Album	»	»	»	»	»	Négatif.
NON CHAUFFÉ	Meij-K. Sérum.	H. complète.	H nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globul.	»	»	H. nulle (partielle).	»	»	Positif.
	— Album.	»	H. nulle (partielle).	H. complète.	H. nulle (partielle).	H. complète.	Faiblement positif (douteux).
	Aff. Sérum.	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globul.	H. presque compl.	»	»	»	»	Positif.
	— Album.	H. complète.	»	H. nulle (partielle).	»	»	Positif.
	He. Sérum.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H complète.	H. complète.	Négatif.
	[He. Globul.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Anticompl.]
	He. Album.	H. complète.	H. presque compl.	H. complète.	H. presque compl.	H. complète.	Négatif.
	Ha. Sérum.	H complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	[Ha. Globul.	H. nulle (partielle).	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Anticompl.]
	Ha. Album.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.

Témoins et contrôles sans faute.
Les indications entre parenthèses indiquent le changement qu'a subi l'aspect des tubes d'un jour à l'autre.

marquée que le sérum ou la globuline. Quant aux albumines d'un sérum négatif, elles réagissent sans exception négativement.

Sachant que l'albumine contient encore une quantité notable de globuline, l'idée s'imposait que la réaction de l'albumine pourrait dépendre de cette substance et que l'albumine par elle-même réagirait négativement. Pour cette raison, j'ai tâché d'obtenir toute la globuline qui se laisse séparer du sérum au moyen de la dialyse, en appliquant la *dialyse fractionnée*.

Protocole III. — Sérum A, positif, du 1er mai 1918, chauffé, et sérum B, négatif, du 4, également chauffé. Le 7, 1 cent. cube de chaque sérum est mis dans le dialyseur, plongé dans 100 cent. cubes d'Aq. dist.; le 8, centrifugé; la globuline est ramassée (y compris celle qui recouvre la membrane, en rinçant le dialyseur avec de l'eau distillée) et est conservée à la glacière.

L'albumine est dialysée à nouveau. L'eau distillée ne contenait pas de substance albuminoïde, mais beaucoup de sel marin.

Les 9 et 10 mai 1918, mêmes manipulations. Les albumines A et B ont maintenant augmenté de volume l'une et l'autre jusqu'à 4 c. c. 4. Elles sont rendues isotoniques et diluées jusqu'à 5 cent. cubes. Les globulines de chaque sérum sont réunies et dissoutes dans 1 cent. cube de liquide physiologique. La dissolution est presque complète en ajoutant six petites anses de KOH 10 p. 100. La globuline est diluée jusqu'à 5 cent. cubes et la réaction de Wassermann installée.

Résultat : tableau IX.

J'ai en effet réussi dans cette expérience à obtenir d'un sérum positif une albumine négative. Il va sans dire que cela peut partiellement provenir de pertes de substances, de fautes de technique, lesquelles auraient pour effet de réduire l'intensité de la réaction de la globuline se trouvant encore dans l'albumine, mais il est invraisemblable que la réaction se montrerait *distinctement* positive, abstraction faite de ces pertes.

Le sérum négatif a maintenant fourni une globuline qui n'est pas anticomplémentaire, mais qui donne un Wassermann positif, bien que léger et douteux.

Or, dans une autre série d'expériences, exécutées de la même manière, des globulines de sérums positifs et négatifs ont été obtenues qui toutes étaient fortement anticomplémentaires. La température de l'atmosphère était, pendant ces jours, très chaude et il n'est pas impossible qu'un développement de microbes soit en cause.

TABLEAU IX.

$p = 0,2$; $q_1 = q_2 = 0,3$

NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT		WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT		INTERPRÉTATION
		0,3	0,4	0,3	0,4	
A.. Sérum.	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
A.. Globul.	»	H. presque nulle.	H. partielle (presque complète).	H. nulle.	H. partielle.	Positif.
A.. Album.	H. presque complète (compl.).	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	*Négatif.*
B.. Sérum.	H. complète.	H. presque complète.	H. complète.	H. presque complète.	H. complète.	Négatif.
B.. Globul.	»	H. presque nulle (partielle).	»	H. nulle.	H. presque complète (compl.).	Faiblement positif. Douteux.
B.. Album.	H. presque complète (compl.).	H. complète.	»	H. complète.	H. complète.	Négatif.

Témoins et contrôles sans faute.

Les indications entre parenthèses indiquent le changement qu'a subi l'aspect des tubes d'un jour à l'autre.

Pour entraver et éviter l'influence des bactéries, j'ai eu recours à la *dialyse dans la glacière.*

Protocole IV. — Les sérums Do., El., Ti., et Di., du 23 juin 1918, chauffés et stériles, sont, en raison de 1 cent. cube, mis dans le dialyseur le 28, plongés dans 100 cent. cubes d'Aq. dist. et placés dans la glacière; le 29, l'eau distillée est renouvelée (elle ne contenait pas de substances albuminoïdes, mais beaucoup de sel marin).

Le 30, j'ai centrifugé la globuline et j'ai séparé l'albumine; l'albumine est placée de nouveau dans le dialyseur rincé, puis avec la globuline, elle est placée à la glacière. Le 31, les albumines sont centrifugées de nouveau. Elles ont augmenté en volume : Do. jusqu'à 2 c. c. 8, El. à 3 c. c. 4, Ti. à 3 c. c. 4, Di. à 3 c. c. 4; sont diluées jusqu'à 5 cent. cubes et additionnées de la quantité de sel marin nécessaire pour que le liquide soit isotonique. Les globulines rassemblées sont dissoutes dans 1 cent. cube de liquide physiologique, sans addition de KOH, et diluées jusqu'à 5 cent. cubes. Les solutions sont un peu troubles, à l'exception de celle de Ti., qui est complètement claire. Le Wassermann est fait le 31.

Résultat : tableau X.

Le résultat est un peu embarrassant. La globuline d'un sérum positif se montre dans cette expérience positive également, mais l'albumine l'est aussi; dans un cas (Do.) l'albumine l'est moins distinctement que le sérum ou la globuline, dans un autre (Ti.) au contraire elle l'est plus nettement. Les albumines des sérums négatifs sont encore négatives, mais les globulines, *tout en ne réagissant pas anticomplémentairement*, donnent un Wassermann faiblement positif.

Pour en rechercher une explication, j'ai étudié si les quantités de globuline des sérums négatifs, *obtenues par la dialyse*, n'étaient peut-être pas notablement plus grandes que celles des sérums positifs. Pour cela j'ai mis dans de petits verres gradués une quantité déterminée de la solution de globuline et j'ai ajouté une quantité précise d'eau distillée et de réactif d'Esbach, imitant ainsi le procédé en usage courant pour l'analyse des urines. L'ensemble du précipité a été mesuré après une sédimentation de vingt-quatre heures. Les chiffres ainsi obtenus n'ont, cela va sans dire, qu'une valeur relative, mais ils permettent pourtant d'établir une comparaison.

Ces chiffres, pour les sérums étudiés, sont les suivants : Do. 0,9, El. 0,25, Ti. 0,25 et Di. 0,5; ils diffèrent trop pour autoriser une conclusion.

Partant ensuite de l'idée que la globuline pourrait être

TABLEAU A.

$p = 0,2; \quad q_1 = q_2 = 0,3$

NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT 0,3	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT 0,4	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT 0,3	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT 0,4	INTERPRÉTATION
Do. Sérum.	H. complète.	H. nulle.	H. nulle (presque nulle).	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
— Globul.	»	»	H. nulle.	»	»	Positif.
— Album.	»	H. nulle (presque nulle).	H. partielle.	H. nulle (presque nulle).	H. partielle.	Positif.
El.. Sérum.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
— Globul	»	H. presque nulle (partielle).	H. partielle (presque complète).	H. nulle (presque nulle).	H. partielle (presque compl.).	Positif.
— Album.	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
Ti.. Sérum.	H. complète.	H. partielle (presque complète).	H. presque complète (compl.).	H. presque nulle (partielle).	H. partielle (presque compl.).	(Faiblement) positif.
— Globul.	»	H. partielle (presque complète).	H. presque complète (compl.).	H. presque nulle (partielle).	H. partielle (presque compl.).	(Faiblement) positif.
— Album	»	H. nulle (partielle).	H. partielle.	H. nulle (presque nulle).	H. presque nulle (partielle).	Positif.
Di.. Sérum.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
— Globul	»	H. partielle.	H. partielle (complète).	H. presque nulle (partielle).	H. partielle (presque complète).	(Faiblement) positif.
— Album.	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.

Témoins et contrôles sans faute.
Les indications entre parenthèses indiquent le changement qu'a subi l'aspect des tubes d'un jour à l'autre.

rendue anticomplémentaire ou positive par les microbes, j'ai fait des préparations microscopiques des sédiments de globuline et, malgré le séjour à la glacière pendant quelques jours seulement, j'en ai trouvé dans chaque préparation une quantité plus ou moins grande, surtout en forme de bâtonnets.

L'emploi du chloroforme dans l'eau distillée ou du toluol sur le sérum dans le dialyseur ne donnant pas des résultats pratiques, j'ai renoncé à la dialyse prolongée dans l'eau distillée. Les recherches ayant pour but d'établir les qualités dialysantes de la membrane amniotique préparée, m'avaient appris d'ailleurs qu'elle était toujours imperméable pour les substances albuminoïdes, mais au contraire très perméable pour les sels. J'étais donc autorisé à me servir pour la *dialyse d'eau courante*.

Protocole V. — Les sérums Be., Li., du 12 septembre 1918, et Go. du 5, tous les trois inactivés, sont mis, le 12 en quantité de 1 cent. cube dans le dialyseur et dialysés dans de l'eau courante pendant quatorze heures. La globuline et l'albumine sont centrifugées et séparées, diluées jusqu'à 5 cent. cubes avec de l'eau distillée et isotonisées. La globuline se dissout complètement. Le Wassermann a été pratiqué le 13.

Résultat : tableau XI. — Les chiffres, indiquant la proportion relative de globuline sont : Be. 0,3, Go. 0,6 et Li, 0,5. Il résulte donc de cette expérience que la quantité de globuline n'influe pas sur la réaction de Wassermann (Be. 0,3, Li. 0,5).

La globuline d'un sérum négatif réagit maintenant complètement négativement. C'est la principale conclusion à tirer de cette expérience.

Pour finir cette série d'expériences, je donne un résumé des résultats, sans détails sur la technique suivie (tableau XII).

D'après ce résumé et surtout en comparant les spéciaux résultats des divers Wassermann entre eux, les expériences mentionnées jusqu'ici donnent lieu aux conclusions suivantes :

1° La globuline *extraite par la dialyse* d'un sérum *positif* réagit *positivement*.

2° Le reste du sérum, albumine, contenant encore une plus ou moins grande quantité de globuline, réagit aussi positivement, mais *souvent moins nettement* que le sérum ou la globuline. Une fois elle réagissait négativement.

3° La globuline extraite par la dialyse d'un sérum négatif

TABLEAU XI.

$p = 0,2$; $q_1 = q_2 = 0,25$ (entre 0,3 et 0,2)

NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT		WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT		INTERPRÉTATION
		0,25	0,35	0,25	0,35	
Be.. Sérum.	H. complète.	H. nulle (partielle).	H. partielle (complète).	H. nulle (partielle).	H. partielle (complète).	Positif.
— Globul.	»	H. nulle (partielle).	H. presque complète (compl.).	H. nulle (partielle).	H. partielle (complète).	Positif.
— Album.	»	H. nulle (partielle).	H. partielle (complète).	H. nulle (partielle).	H. partielle (presque complète).	Positif.
Li... Sérum.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
— Globul.	»	»	»	»	»	Négatif.
— Album.	»	»	»	»	»	Négatif.
Go. Sérum.	H. complète.	H. nulle (partielle).	H. presque nulle (partielle).	H. nulle.	H. nulle (partielle).	Positif.
— Globul.	»	H. nulle (partielle).	H. partielle.	H. nulle.	H. nulle (partielle).	Positif.
— Album.	»	H. nulle.	H. nulle (partielle).	H. nulle.	H. nulle.	Positif.

Témoins et contrôles sans faute.

Les indications entre parenthèses indiquent le changement qu'a subi l'aspect des tubes d'un jour à l'autre.

Tableau XII. — **Résumé.**

SÉRUMS POSITIFS				SÉRUMS NÉGATIFS			
	WASSERMANN				WASSERMANN		
NOMS	du sérum	de la globuline	de l'albumine	NOMS	du sérum	de la globuline	de l'albumine
Pae.	+	+	+	»	»	»	»
Pae.	+	+	±(—?)	Ke.	—	—	—
Meij-K (1) . .	+	+	±(—?)	He. (1) . . .	—	A	—
Aff. (1). . . .	+	+	+	Ha. (1) . . .	—	A	—
A.	+	+	—	B. . . .	—	±(—?)	—
Do.	+	+	+	El.	—	+	—
Ti.	+(±)	+(±)	+	Di.	—	+(±)	—
Be.	+	+	+	Li.	—	—	—
Go.	+	+	+	»	»	»	»

\+ = Positif.
± = Faiblement positif.
— = Négatif.
A = Anticomplémentaire.

Les sérums sont rangés en groupes renfermant les Wassermann qui ont été exécutés chaque fois en une séance.
Les sérums et les globulines marqués par (1) n'ont pas été inactivés.

peut réagir négativement. Cependant, elle peut donner aussi une réaction positive, mais pas aussi distincte que celle d'un sérum positif. Elle peut être aussi totalement anticomplémentaire. Pourtant il semble que cette particularité peut être la conséquence d'influences extérieures (1), bactériennes peut-être, agissant sur la globuline *précipitée*. En faveur de cette hypothèse plaide le fait que l'albumine des sérums négatifs, bien que contenant de la globuline, réagit toujours négativement.

Or il est remarquable que l'albumine exposée aux mêmes influences que la globuline n'ait jamais montré d'action anticomplémentaire. Cette particularité ne me paraît pas sans importance pour la théorie de la réaction de Wassermann.

(1) Il va sans dire qu'une telle influence peut être aussi supposée pour ce qui concerne les globulines des sérums positifs; pourtant la régularité avec laquelle la globuline et l'albumine réagissent positivement paraît justifier l'interprétation donnée.

Dans les expériences décrites précédemment j'ai été surtout frappé par les deux faits suivants :

1° Que la petite quantité de globuline, extraite d'un sérum positif, était en état de donner une réaction parfaitement comparable à celle du sérum complet;

2° Que l'albumine d'un tel sérum, ou plus exactement qu'un sérum positif débarrassé d'une certaine quantité de sa globuline, pouvait réagir moins distinctement que le sérum complet ou que la globuline seule, une fois même négativement.

De là l'obligation d'avoir recours à une méthode permettant d'opérer avec la globuline entière d'un sérum et avec l'albumine complètement dépourvue de globuline.

En premier lieu, je me suis servi de la

II. — Séparation au moyen du sulfate de magnésium.

J'ai appliqué la méthode de Denis-Hammersten de la manière suivante :

Un tube à centrifugation, contenant 1 cent. cube de sérum, quelquefois plus (dans les premières expériences neutralisé avec de l'acide acétique, mais comme cela ne présentait aucun avantage, je l'ai supprimé par la suite), est placé dans un bocal, rempli d'eau à une température de 40°. On ajoute peu à peu du $MgSO_4$, pulvérisé, en agitant le tube pour bien le mélanger et le dissoudre, jusqu'à ce qu'apparaisse un trouble manifeste. Alors une petite quantité de sel est encore surajoutée et les tubes, encore plongés dans l'eau, sont mis à l'étuve à 37° C pendant quelques heures.

Ces tubes sont alors centrifugés pendant longtemps, jusqu'à ce que la globuline soit précipitée complètement. Le plus souvent la séparation s'établit distinctement, l'albumine claire surnageant la globuline d'une blancheur manifeste. Quelquefois cependant, la séparation par la centrifugation échoue; alors c'est que la quantité de sel ajoutée a été trop considérable. Lorsqu'il s'est formé un précipité compact de globuline et que le liquide albumineux est devenu clair, celui-ci est décanté ou aspiré avec une pipette Pasteur très effilée et rejeté dans un dialyseur. La globuline est dissoute dans quelques centimètres

cubes d'eau distillée, ce qui s'accomplit complètement grâce à la présence du $MgSO_4$, et elle est aussi versée dans un dialyseur. Les diverses globulines et albumines d'une expérience furent dialysées ensemble dans l'eau courante. La durée de la dialyse a été de dix-huit à vingt-quatre heures. Après ce laps de temps les solutions de globulines étaient devenues troubles, démontrant que le $MgSO_4$ avait disparu, du moins en grande partie.

En effet l'addition du $Ba(NO_3)_2$ à ces globulines, de nouveau dissoutes au moyen de sel marin, ne causait qu'un trouble égal ou un peu plus net que celui qu'elle donnait dans l'eau sortant du robinet.

Le liquide albumineux et celui renfermant la globuline furent dilués avec de l'eau distillée jusqu'à 5 cent. cubes (ou la valeur convenable) et rendues isotoniques par la quantité nécessaire de sel marin. Les solutions de globuline étaient toujours complètes, elles montraient une légère opalescence. Celles d'albumine étaient claires, sans opalescence.

La majorité des sérums, employés pour ces recherches, étaient frais. Ils furent choisis parmi les sérums envoyés au laboratoire pour la réaction de Wassermann, et toujours séparés et dialysés le jour précédant l'exécution de cette réaction. Alors ces sérums, leurs globulines et leurs albumines furent examinés avec d'autres sérums en une même séance.

Les résultats qu'ont donnés ces expériences ont été tellement démonstratifs et uniformes, qu'il me paraît superflu de donner tous les protocoles à peu près semblables. Je me bornerai donc à donner un tableau renfermant les comptes rendus des Wassermann et un tableau fournissant un aperçu général (tableaux XIII et XIV).

Avant de tirer les conclusions, il faut signaler qu'aucun des produits n'a montré, comme dans les expériences précédentes, une réaction anticomplémentaire. Par conséquent il est permis d'interpréter tous les résultats de la même façon.

Considérant les sérums *positifs* il est évident :

1° Que *toutes* leurs *globulines* réagissent positivement. Il n'y a aucune exception. Elles se comportent en général comme le sérum. Elles donnent quelquefois une réaction plus marquée que lui, parfois aussi, mais plus rarement, une réaction plus faible;

2° Que les *albumines* se comportent *d'une manière différente*. Il y en a qui réagissent comme le sérum et la globuline, mais la majorité d'entre elles réagit plus faiblement ou même négativement. La réaction négative s'obtient avec les albumines de sérums, qui eux-mêmes ont manifesté une réaction faible.

Or, quand on étudie le tableau des comptes rendus des réactions de Wassermann avec attention, on observe que l'albumine, même lorsque sa réaction doit être mentionnée comme positive, montre une tendance à fournir des résultats plus faibles que le sérum ou la globuline (voir les numéros 1, 2, 6, 31).

Les recherches avec les sérums *négatifs* démontrent, sans aucune hésitation, que leurs globulines *ne donnent pas le Wassermann*; il en est de même de leurs albumines.

Bien que le nombre des sérums qui ont été séparés sans être inactivés soit petit, il me semble que les résultats sont les mêmes quand on opère avec les globulines et les albumines obtenues de sérums actifs ou chauffés avant la séparation.

Il a été démontré, entre autres par Noguchi, que la quantité de globuline dans le sérum d'un syphilitique est plus grande que dans un sérum normal. Bien qu'une pareille augmentation de globuline s'observe aussi à la suite d'autres infections, on pouvait pourtant supposer que le caractère particulier de la globuline d'un sérum positif dépendait de ce qu'elle se trouvait dans ce sérum en quantité plus grande.

Or les expériences avec la globuline, obtenue par la dialyse seule, ont déjà démontré qu'une petite quantité de globuline suffisait pour réaliser une réaction distincte. Pourtant, pour confirmer ce résultat d'une façon plus certaine, j'ai apprécié, dans la plupart des cas, la quantité de globuline par la méthode d'Esbach, comme je l'ai décrit plus haut. Les valeurs qui résultent de ces épreuves sont placées dans le tableau XIV. Elles démontrent clairement que le taux de globuline des sérums positifs est en général plus élevé que celui des sérums négatifs, mais il y a pourtant des sérums négatifs, qui ont une quantité qui dépasse celle des sérums positifs (de R. et v. Zw., Be. et Li.).

Toutes ces considérations réunies permettent de conclure,

Témoins et contrôles sans faute. — Les indications entre parenthèses indiquent le changement qu'a subi l'aspect des tubes d'un jour à l'autre (non recherché dans toutes les expériences). Les dates dans la deuxième colonne indiquent chaque fois : le premier, le jour de la ponction veineuse ; le deuxième, le jour du chauffage du sérum ; le troisième, le jour de l'exécution du Wassermann.

NUMÉRO	NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT		WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT		INTERPRÉTATION
			q_1	$q_1 + 1/2\,p$	q_2	$q_2 + 1/2\,p$	
			SÉRUMS INACTIVÉS				
1	22-23-30 Juin 1918. Do... Sérum. . . .	H. complète.	H. nulle.	H. nulle (presque nulle).	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline . .	»	»	H. nulle.	»	»	Positif.
	— Albumine . .	»	»	H. presq. nulle (partielle).	»	H. nulle (presque nulle).	Positif.
2	30-30-30 Juin 1918. En... Sérum. . . .	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline . .	»	H. nulle.	H. nulle (partielle).	H. nulle.	H. nulle (presque nulle).	Positif.
	— Albumine . .	»	H. part. (presque compl.).	H. complète.	H. partielle.	H. presq. complète.	Faiblem. positif (douteux).
3	22-23-30 Juin 1918. Ti... Sérum. . . .	H. complète.	H. part. (presque compl.).	H. presq. complète (compl.)	H. presq. nulle (partielle).	H. part. (presque compl.).	(Faiblement) positif.
	— Globuline . .	»	H. nulle.	H. nulle (presque nulle).	H. nulle.	H. nulle (presque nulle).	Positif.
	— Albumine . .	»	H. nulle (partielle).	H. part. (presque compl.).	H. nulle (partielle).	H. presq. nulle (partielle).	Positif.
4	6-6-7 Juillet 1918. To... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
5	5-6-7 Juillet 1918. Ma... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
6	6-6-7 Juillet 1918. Va... Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H. partielle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	H. partielle.	H.presq.compl.	H. partielle.	H.presq.compl	Faiblem. pos.

7	6-6-7 Juillet 1918.						
	Br... Sérum	H. complète.	H. presq. compl.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. complète.	»	»	»	Négatif.
	— Albumine . . .	»	»	»	»	»	Négatif.
8	12-13-14 Juillet 1918.						
	La... Sérum	H. complète.	H. presp. complète.	H. complète.	H. presq. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. complète.	»	H. complète.	»	Négatif.
	— Albumine . . .	»	»	»	»	»	Négatif.
9	12-13-14 Juillet 1918.						
	Da... Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. presq. complète.	H. nulle.	H. partielle.	Faiblement positif.
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	H. complète.	H. nulle.	H. complète.	Faiblem. positif (douteux).
	— Albumine. . .	»	H. presq. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
10	13-13-14 Juillet 1918.						
	Li... Sérum	H. complète.	H. partielle.	H. complète.	H. presq. complète.	H. presq. complète.	Faiblement positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	»	H. nulle.	H. partielle.	(Faiblem.) pos.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	»	H. complète.	H. complète.	Négatif.
11	13-13-14 Juillet 1918.						
	Ko... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
12	19-20-21 Juillet 1918.						
	De G. Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	H. presq. complète (compl.)	H. complète.	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H. presq. complète (compl.)	»	H. presq. complète (compl.)	H. complète.	Négatif.
13	19-20-21 Juillet 1918.						
	Mas. Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	H. presq. complèle (compl.)	H. presq. complète (compl.)	»	H. presq. complète (compl.)	H. complète.	Négatif.
	— Albumine. . .	H. complète.	H. presq. complète (compl.)	»	»	»	Négatif.
14	19-20-21 Juillet 1918.						
	De R. Sérum	H. complète.	H. nulle (partielle).	H. nulle (partielle).	H. nulle (presque nulle).	H. nulle (presque nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle (presque nulle).	H. nulle (presque nulle).	H. nulle (presque nulle).	H. nulle (presque nulle)	Positif.

NUMÉRO	NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT q_1	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT $q_1 + 1/2\,p$	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT q_2	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT $q_2 + 1/2\,p$	INTERPRÉTATION
15	19-20-21 Juillet 1918.						
	v.Zw. Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	H.presq.compl. (complète).	»	Négatif.
16	19-20-21 Juillet 1918.						
	v.R... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H. presq. complète (compl.)	»	H. presq. complète (compl.)	»	Négatif.
17	4-4-5 Août 1918.						
	v.d.Z. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	H. nulle (part.).	H. part. (presq. compl.).	H. nulle (part.).	H. partielle (complète).	(Faiblem). pos.
18	4-4-19 Août 1918.						
	v.d.Z. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	
19	4-5-19 Août 1918.						
	H.B... Sérum	H. complète.	H.presq.compl.	H. complète.	H.presq.compl.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	
20	3-5-19 Août 1918.						
	Vall. Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Albumine. . .	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	Pas exécuté.	
21	12-12-13 Septembre 1918.						
	Be... Sérum	H. complète.	H. nulle (part).	H.nulle(compl.)	H. nulle (part.)	H.part.(compl.)	Positif.
	— Globuline. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	H. nulle (part.).	Pas exécuté.	Positif.
	— Albumine. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	H. presq. complète.	»	Négatif.
22	5-6-13 Septembre 1918.						
	Go... Sérum	H. complète.	H. nulle (presque nulle).	H. presq. nulle (partielle).	H. nulle.	H. nulle (presq. nulle).	Positif.
	— Globuline. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	H. nulle.	Pas exécuté.	Positif.
	— Albumine. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	H. nulle (presq. nulle)	»	Positif.

23	12-12-13 Septembre 1918.						
	Li... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	»	Pas exécuté.	Négatif.
	— Albumine. . .	»	Pas exécuté.	Pas exécuté.	»	»	Négatif.
24	18-19-27 Septembre 1918.						
	Sm... Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	Faiblem. posit.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	H. complète.	H.presq.compl.	H. complète.	Négatif.
25	18-19 27 Septembre 1918.						
	Br... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	.	»	»	»	»	Négatif.
	SÉRUMS ACTIFS						
26	26-28-28 Juin 1918.						
	v.Z... Sérum , . . .	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H.presq.compl. (complète).	H. complète.	H.presq.compl. (complète).	H. complète.	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H.presq.compl. (complète).	H. complète.	H.presq.compl. (complète).	H. complète.	Négatif.
27	26-28-28 Juin 1918.						
	Zw... Sérum	H. complète.	H. partielle.	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	(Faiblem.) pos.
	— Globuline. . .	»	H. presq. nulle	H.presq.compl.	H. nulle (presq. nulle).	H. partielle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	H.presq.compl. (complète).	H. complète.	H. part. (presque compl.).	H. complète.	Négatif.
28	26-28-28 Juin 1918.						
	Kn... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
29	26-28-28 Juin 1918.						
	Ba... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète,	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H.presq.compl.	»	H.presq.compl.	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
30	27-28-28 Juin 1918.						
	v.d.M. Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	»
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	»
31	4-4-5 Juillet 1918.						
	v.d.Z. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	H. nulle (pres-	H. part. (com-	H. nulle (presq.	H. presq. com-	(Faiblem.) pos.

Tableau XIV. — **Séparation au moyen du sulfate de magnésium.** (**Résumé.**)

Sérums positifs (chauffés avant la séparation)				Sérums négatifs (chauffés avant la séparation)			
Noms et numéros	Wassermann du sérum	Wassermann de la globuline	Wassermann de l'albumine	Noms et numéros	Wassermann du sérum	Wassermann de la globuline	Wassermann de l'albumine
Do.. . (1)	+	+ 3,0	+				
En.. . (2)	+	+ 2,8	±(?				
Ti. . . (3)	± (+)	+ 1,5	+				
Va.. . (6)	+	+ 0,8	±	To.. . . (4)	—	— 0,5	—
				Ma.. . . (5)	—	— 0,6	—
				Br.. . . (7)	—	— 0,4	—
Da.. . (9)	±	±(-?) 1,6	—	La.. . . (8)	—	— 1,0	—
Li. . . (10)	±	+(±) 1,2	—	Ko.. . . (11)	—	— 1,0	—
De R. (14)	+	+ 1,0	+	De G.. . (12)	—	— 0,7	—
				Mas. . . (13)	—	— 0,7	—
				v.Zw.. . (15)	—	— 1,2	—
				v.R. . . (16)	—	— 1,0	—
V.d.Z. (17)	+	+ 0	+ (±)				
V.d.Z. (18)	+	+ 1,0	0	H. B.. . (19)	—	— 0,8	0
Vall. . (20)	+	+ 1,0	0				
Be.. . (21)	+	+ 0,9	—?	Li. . . . (23)	—	— 1,2	—
Go.. . (22)	+	+ 1,8	+				
Sm.. . (24)	+	± 1,2	—	Br. . . . (25)	—	— 1,0	—
Sérums positifs (séparés actifs)				**Sérums négatifs (séparés actifs)**			
Zw.. . (27)	+ (±)	+	—	V.Z.. . (26)	—	—	—
				Kn. . . (28)	—	—	—
				Ba. . . (29)	—	—	—
				V.d.M. (30)	—	—	—
V.d.Z. (31)	+	+	+ (±)				

\+ = Positif.
± = Faiblement positif.
— = Négatif.
O = Pas exécuté.

Les sérums sont rangés en groupes, renfermant les Wassermann qui ont été exécutés chaque fois en une séance.

Les chiffres, dans la colonne des globulines, indiquent le résultat des « Esbach ».

avec certitude, que la globuline d'un sérum positif possède une particularité toute spéciale.

Les résultats qu'a fournis la séparation par la méthode de Denis-Hammersten aboutissent à cette conclusion que, quoique la globuline soit l'agent principal de la réaction, l'albumine, surtout celle des sérums donnant une réaction de Wassermann forte, donne aussi cette réaction.

Cependant une semblable interprétation ne me paraissait pas permise. Malgré le fait que la méthode de Denis-Hammersten passe pour être parfaitement en état de séparer entièrement et avec certitude la globuline d'un sérum, j'eus raison de m'en méfier. Il n'était pas rare, en effet, qu'après le départ du sulfate de magnésie par dialyse de l'albumine, il se précipita une petite quantité de globuline qui pouvait être écartée par centrifugation. Or, Hammersten a fait ses expériences presque exclusivement avec le sérum de bœuf et il est intéressant de constater, ainsi qu'il le fait remarquer lui-même dans un de ses mémoires originaux, que la méthode ne donne pas toujours des résultats aussi bons avec ce sérum et *que l'albumine contient souvent encore une trace de globuline, se montrant notamment par la dialyse*. Il ajoute également que la méthode se prêtait, d'une manière moins satisfaisante, aux expériences avec le sérum de cheval.

Pourquoi n'en serait-il pas de même avec le sérum de l'homme? Il m'a donc paru nécessaire de considérer que la question concernant l'albumine n'était pas encore résolue et qu'il se pourrait parfaitement que la réaction positive fournie par l'albumine soit la conséquence de la quantité plus ou moins grande de globuline qu'elle contenait encore.

J'ai procédé pour cette raison à quelques recherches en me servant de la

III. — Séparation au moyen du sulfate d'ammonium.

A 1 cent. cube du sérum j'ai ajouté 1 cent. cube d'une solution de sulfate d'ammonium, saturée à chaud, puis qu'on a laissé cristalliser à froid. Le mélange, devenu immédiatement très trouble, est gardé pendant une demi-heure à la température de la chambre, puis centrifugé pendant longtemps. La globuline et l'albumine furent séparées, dialysées et traitées de la même façon que je l'ai décrit antérieurement à propos de la séparation au moyen du sulfate de magnésium.

TABLEAU XV. — **Séparation au moyen du sulfate d'ammonium.**

Témoins et contrôles sans faute. — Les dates dans la deuxième colonne indiquent chaque fois : le premier, le jour de la ponction veineuse; le deuxième, le jour du chauffage du sérum; le troisième, le jour de l'exécution du Wassermann. Chez les numéros 29-35, le Wassermann n'a pas été exécuté avec les albumines.

NUMÉRO	NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT		WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT		INTERPRÉTATION
			q_1	$q_1 + 1/2p$	q_2	$q_2 + 1/2p$	
1	19-19-20 Septembre 1918.						
	Sm... Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H. partielle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Albumine . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
2	18-19-20 Septembre 1918.						
	Ko... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
3	19-19-20 Septembre 1918.						
	De N. Sérum . . .	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
4	19-19-20 Septembre 1918.						
	v. W... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	H. presq. compl.	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	H. complète.	»	Négatif.
5	18-19-27 Septembre 1918.						
	St..., Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H partielle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
6	18-19 27 Septembre 1918.						
	Br... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H. presq. compl.	»	H. presq. compl.	»	Négatif.
7	18-19-27 Septembre 1918.						
	Ble... Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. presq. nulle.	H. nulle.	H. partielle.	Positif.

	Vl... Sérum	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	— Globuline. . .	»	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H. partielle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
9	2-3-4 Octobre 1918.						
	Lou. . Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H.presq.compl.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	»	H. nulle.	H. partielle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
10	2-3-4 Octobre 1918.						
	Kell. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
11	2-3-4 Octobre 1918.						
	Log. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
12	2-3-4 Octobre 1918.						
	Rob. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
13	2-3-4 Octobre 1918.						
	Ros. Sérum	H. complète.	H. partielle.	H. complète.	H.presq.compl.	H.presq.compl.	Faiblem. positif.
	— Globuline. . .	»	»	H. presq. compl.	H. partielle.	H. presq. compl.	Faiblem. positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
14	2-3-4 Octobre 1918.						
	Cr... Sérum	H. complète.	H. presq. compl.	H. complète.	H. presq. compl.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	H. presq compl.	H. partielle.	H. partielle.	Faiblem. positif.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
15	9-10-11 Octobre 1918.						
	H_1... Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
16	9-10-11 Octobre 1918.						
	Ste... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. nulle.	H. partielle.	Positif.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.

NUMÉRO	NOMS	CONTRÔLE du double de la dose de sérum, de globuline ou d'albumine	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT q_1	WASSERMANN AVEC A_1 COMPLÉMENT $q_1 + 1/2p$	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT q_2	WASSERMANN AVEC A_2 COMPLÉMENT $q_2 + 1/2p$	INTERPRÉTATION
17	9-10-11 Octobre 1918.						
	H_2... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. presq. compl.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. presq. compl.	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	»	H. complète.	»	Négatif.
18	9-10-11 Octobre 1918.						
	v.d.W. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
19	9-10-11 Octobre 1918.						
	v.d.P. Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	H. complète.	H. partielle.	H. presq. compl.	Faiblem. positif (douteux).
	— Albumine. . .	»	H. complète,	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
20	9-10-11 Octobre 1918.						
	Em... Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	H. presq. compl.	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	H. complète.	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
21	16-17-18 Octobre 1918.						
	Kl .. Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
	— Albumine acquise par la séparation avec $MgSO^4$.	»	H. partielle.	H. partielle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
22	14-16-18 Octobre 1918.						
	Bi... Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	H. presq. compl.	»	H. presq. nulle.	H. nulle.	»	Positif.
	— Albumine. . .	H. complète.	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
23	15-16-18 Octobre 1918.						
	H_3... Sérum	H. complète.	H. partielle.	H. presq. compl.	H. presq. compl.	H. complète.	Faiblem. positif (douteux).
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	»	H. partielle.	H. complète.	Faiblem. posi-

24	16-17-18 Octobre 1918.						Négatif.
	Hu... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Faiblem. posit.
	— Globuline. . .	»	H. partielle.	H. presq. compl.	H. partielle.	H. presq. compl.	Négatif.
	— Albumine. . .	»	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	
25	15-16-18 Octobre 1918.						
	H_1... Sérum	H. complète.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	H. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
26	15-16-18 Octobre 1918.						
	H_2... Sérum	H. complète.	H. presq. nulle.	H. presq. nulle.	H. nulle.	H. presq. nulle.	Positif.
	— Globuline. . .	»	H. nulle.	H. presq. nulle.	H. nulle.	H. presq. nulle,	Positif.
	— Albumine. . .	»	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*H. complète.*	*Négatif.*
27	2-2-3 Janvier 1919.						
	Cr... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
28	2-2-3 Janvier 1919.						
	v.W... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
	— Albumine. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
29	2-2-3 Janvier 1919.						
	O... Sérum . . .	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
30	2-2-3 Janvier 1919.						
	Ms... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
31	2-2-3 Janvier 1919.						
	Pn... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
32	2-2-3 Janvier 1919.						
	Rh... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	H. presq. nulle.	H. partielle.	H. presq. nulle.	H. partielle.	Positif.
33	2-2-3 Janvier 1919.						
	Gn... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.
34	2-2-3 Janvier 1919.						
	Bl... Sérum	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	H. complète.	Négatif.
	— Globuline. . .	»	»	»	»	»	Négatif.

Tableau XVI. — **Séparation au moyen du sulfate d'ammonium. (Résumé.)**

SÉRUMS POSITIFS (chauffés avant la séparation)				SÉRUMS NÉGATIFS (chauffés avant la séparation)			
NOMS et NUMÉROS	WASSERMANN			NOMS et NUMÉROS	WASSERMANN		
	du sérum	de la globuline	de l'albumine		du sérum	de la globuline	de l'albumine
Sm.. . (1)	+	+ O	—	Ko.. . . (2)	—	—	—
				De N. . (3)	—	—	—
				v. W.. . (4)	—	—	—
St. . . (5)	+	+ 1,5	—	Br.. . . (6)	—	— 1,4	—
Ble. . (7)	+	+ 1,2	—	Vi. . . . (8)	—	+ 1,2	—
Lou. . (9)	+	+ 0,9	—	Cr. . . . (14)	—	± 1,0	—
Kell. . (10)	+	+ 1,0	—				
Log. . (11)	+	+ 0,6	—				
Rob. . (12)	+	+ 0,9	—				
Ros. . (13)	±	± 1,5	—				
H_1 . . (15)	+	+ 1,3	—	Ste.. . . (16)	—	+ 1,0	—
v.d.W. (18)	+	+ 1,4	—	H_2. . . . (17)	—	— 0,9	—
Em. . (20)	+	+ 1,4	—	v.d.P. . (19)	—	±? 1,4	—
Kl. . . (21)	+	+ 1,2	—(1)	Hu.. . . (24)	—	± 1,6	—
Bi. . . (22)	+	+ 1,2	—				
H_3. . . (23)	± (—)	±(—) 1,0	—				
H_1. . . (25)	+	+ 1,2	—				
H_2. . . (26)	+	+ 1,2	—				
				Cr. . . . (27)	—	— 1,5	—
				v. W.. . (28)	—	— 1,3	—
				O. . . . (29)	—	— 1,4	O
				Ms.. . . (30)	—	— 1,5	»
				Pn.. . . (31)	—	— 1,3	»
				Rh.. . . (32)	—	+ 1,2	»
				Gn.. . . (33)	—	— 1,7?	»
				Bl. . . . (34)	—	— 1,3	»

(1) + avec $MgSO_4$.

+ = Positif.
± = Faiblement positif.
— = Négatif.
O = Pas exécuté.

Les sérums sont rangés en groupes, renfermant les Wassermann qui ont été exécutés chaque fois en une séance.

Les chiffres dans la colonne des globulines indiquent le résultat des « Esbach ».

Les résultats de ces recherches pour lesquelles furent employés seulement des sérums inactivés, étaient très satisfaisants. Pas plus qu'avec le sulfate de magnésium, les produits ne montraient une action anticomplémentaire.

En considérant les sérums *positifs*, il est maintenant démontré, avec une certitude absolue, que la globuline en est la *seule* substance qui cause la réaction de Wassermann. *L'albumine, débarrassée complètement de globuline, réagit tout à fait négativement*, même quand elle provient de sérums qui donnent une réaction des plus nettes.

Cette série d'expériences démontre clairement l'efficacité de la précipitation de la globuline au moyen du sulfate d'ammonium.

On peut le constater spécialement au sérum Kl (n° 21 des tableaux XV et XVI), lequel fut en même temps séparé avec le sulfate de magnésium et avec le sulfate d'ammonium. Seulement en usant la dernière substance on aboutit à une albumine négative.

On pourrait objecter qu'après la séparation de la majeure partie de l'albumine, il en est resté une trace dans la globuline précipitée et que cette trace exerce une influence sur la genèse de la réaction de Wassermann. L'expérience suivante prouve qu'il n'en est pas ainsi.

Protocole VI. — Les sérums W., de W., et H., obtenus par ponction veineuse le 2 avril 1919 et chauffés ce même jour, sont chacun à la dose de 1 cent. cube traités, comme il a été déjà décrit, avec 1 cent. cube de la solution saturée de sulfate d'ammonium et centrifugés jusqu'à séparation complète de la globuline. L'albumine est aspirée minutieusement et rejetée. Les tubes à centrifugation, contenant les sédiments des globulines, sont remplis avec une solution de sulfate d'ammonium à demi saturée et les sédiments lavés comme on le fait avec les hématies. Cette manipulation est exécutée trois fois. Par la longue durée de la centrifugation il n'est pas possible de faire la réaction ce même jour et on est forcé de laisser les globulines, n'étant pas totalement séparées du liquide surnageant, qui est un peu opalescent, une nuit à la glacière. Le 3 avril 1919 les sédiments des globulines sont dissous avec de l'eau distillée et mis à dialyser pendant vingt-quatre heures.

Les solutions de globuline, devenues troubles, sont diluées et rendues isotoniques et on fait la réaction de Wassermann (en même temps avec d'autres sérums) comme dans les expériences antérieures.

Le résultat a été :

Noms		Résultat de la réaction de Wassermann
W...	Sérum	négatif.
	Globuline	négatif.
De W...	Sérum	positif.
	Globuline	positif.
H...	Sérum	positif.
	Globuline	positif.

Lorsqu'on étudie dans le tableau XV de plus près les comptes rendus des différents Wassermann, on peut observer sans peine que la globuline produit une réaction d'une intensité quelquefois un peu plus forte que celle du sérum complet (voir les n°s 1, 5, 7, 9, 13 et 26). La même remarque pouvait aussi être faite avec les globulines séparées au moyen du sulfate de magnésium.

D'abord, il m'a paru que cela était la conséquence du fait que la globuline isolée a la faculté de réagir plus fortement que le sérum complet. Il serait possible que la globuline dévie plus fortement le complément grâce à la disparition (par suite de sa séparation seule ou par la dialyse) d'une substance antagoniste. Friedemann (l. c.), qui a observé le même fait, admet que c'est l'albumine qui, dans le sérum, diminue l'action de la globuline.

Pour ma part, supposant pour un moment qu'une substance antagoniste est véritablement en cause, l'albumine ne joue pas ce rôle. Comment serait-il alors possible, comme je l'ai montré nettement après la séparation au moyen du sulfate de magnésium, que l'albumine, contenant seulement une quantité minime de globuline, puisse produire une réaction de Wassermann distinctement positive ?

La question, n'étant pas dénuée d'intérêt, m'a stimulé à faire des expériences pour la résoudre.

Dans ce but, j'ai recherché la relation *quantitative* qui existe entre la réaction produite par une quantité de sérum et celle manifestée par la quantité de globuline, que contient cette même quantité de sérum.

J'ai pris deux doses égales d'un même sérum. L'une servit pour en faire les dilutions en série du sérum complet, l'autre

pour en obtenir la globuline totale, laquelle, après la dialyse, fut examinée dans des dilutions exactement comparables avec celles du sérum complet.

Pour faciliter l'exposition et l'appréciation de la technique de ces expériences et des diagrammes qui indiquent leurs résultats, il suffira de reproduire une seule expérience comme exemple. Pour cela je choisis celle d'où sont nés les diagrammes n°s 8 et 9.

Protocole VII. — Les sérums Zo. et De., obtenus par ponction veineuse le 2 juillet 1919 et inactivés ce même jour, sont, le 3, traités avec la solution saturée de sulfate d'ammonium. Le sérum Zo., dont on n'a qu'une quantité restreinte, est (par exception) mis à la dose de 0 c. c. 6, dans un tube à centrifugation, dans lequel on verse ensuite 0 c. c. 6 de sulfate d'ammonium. Concernant le sérum De., on a opéré, comme pour les autres sérums de cette série d'expériences, avec les quantités de 1 c. c. 2 de sérum et de 1 c. c. 2 de la solution du sulfate. (En se servant de quantités un peu grandes on diminue naturellement les pertes de substances, causées par les manipulations.)

Les tubes sont laissés pendant une demi-heure à la température de la chambre et puis centrifugés fortement pendant au moins une demi-heure. La globuline s'est séparée franchement de l'albumine, entièrement limpide. Celle-ci est aspirée en totalité avec une pipette Pasteur bien effilée.

Les globulines sont dissoutes dans peu d'eau distillée et mises dans les dialyseurs. Les tubes sont rincés trois fois et on a soin de verser l'eau de rinçage aussi dans les dialyseurs. Pour l'albumine et la globuline du sérum Zo., on se sert de dialyseurs d'un diamètre de 2 cent. 5, tandis que pour le sérum De. on fait usage de ceux d'un diamètre de 4 centimètres. La dialyse est continuée pendant vingt-sept heures et demie dans de l'eau courante. Après ce laps de temps les solutions de globulines sont devenues fortement troubles, il y a un précipité floconneux notable. Les globulines sont versées soigneusement dans de petits verres gradués, les dialyseurs rincés avec de l'eau distillée et l'eau de rinçage ajoutée. Pour le sérum Zo. on complète le volume jusqu'à 3 cent. cubes et pour celui de De. jusqu'à 6 cent. cubes. On fait de même avec les albumines. Ensuite on ajoute la quantité nécessaire de sel marin sec pour isotoniser. Les globulines se dissolvent de nouveau. Les sérums complets sont dilués dans les mêmes proportions, mais avec de l'eau salée. On a soin de faire usage pour toutes les substances des mêmes vases et pipettes.

L'épreuve préparatoire donne pour résultat que p est plus petit que 0,2, mais plus grand que 0,1, tandis que q est exactement $= 0{,}2$ On prend pour p 0,2, de sorte que $q + 1/2\,p$ devient 0,3.

Dans les tubes on met 0 c. c. 5 de l'antigène dilué (extrait alcoolique d'une poudre d'un cœur de bœuf, préparé comme ordinairement, et d'une efficacité très satisfaisante), et des doses décroissantes de la dilution du sérum ou de la globuline et des doses égales du complément, à savoir $q = 0{,}2$. Tous les tubes sont complétés jusqu'au volume de 2 c. c. 5. Avec les albumines on fait le Wassermann usuel, pour cette expérience naturellement seulement avec un antigène.

Les résultats sont reproduits dans le tableau XVII, lequel n'indique que les quantités de sérum et de globuline dont il s'agit.

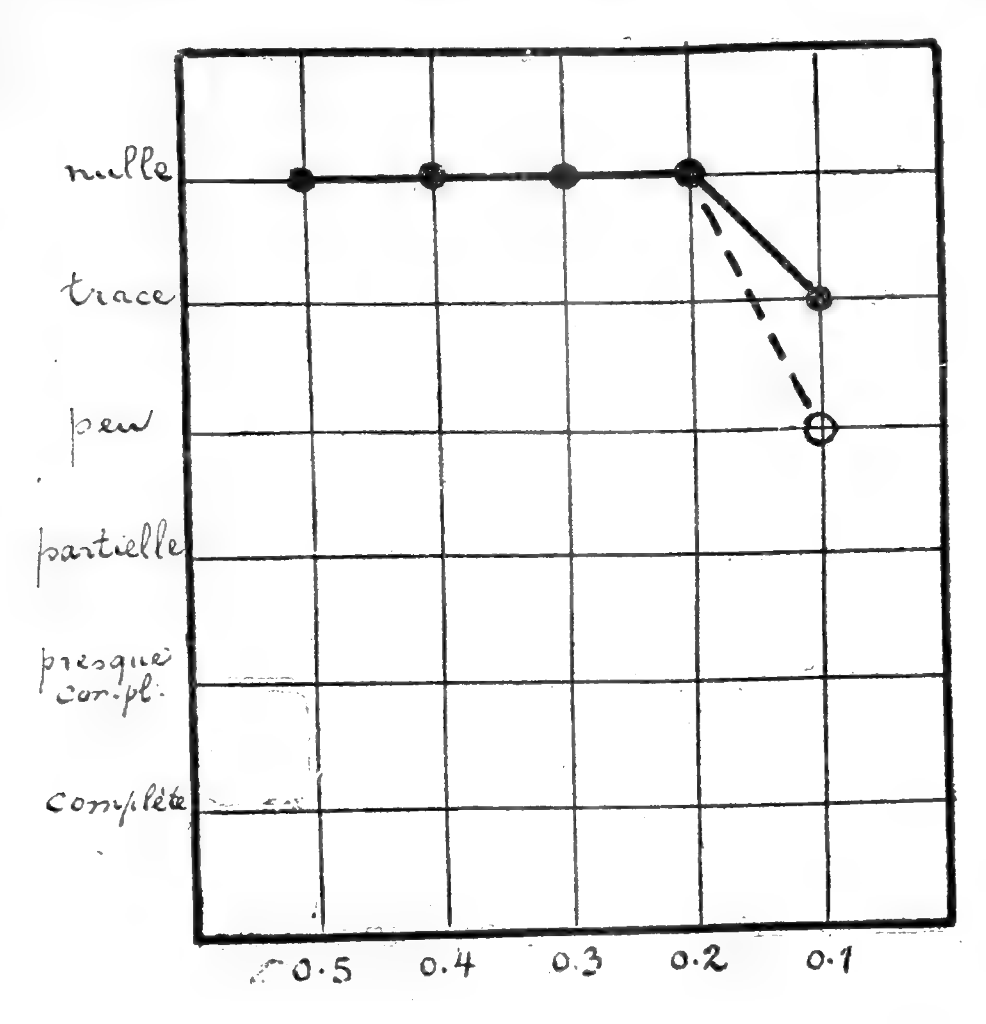
TABLEAU XVII.

NOMS	CONTRÔLE double des sérums et des globulines aux doses usuelles (1 c.c.)	DOSES DE SÉRUM COMPLET OU DE SA GLOBULINE se rapportant à la dilution 1 : 5 du sérum.						
		0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,006
Zo. sérum. .	H. compl.	nulle.	nulle.	nulle.	nulle.	trace.	peu.	peu.
Zo. globuline	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.	peu.	partielle.	partielle.
De. sérum. .	Id.	Id.	Id.	Id.	Id	nulle.	trace.	trace.
De. globuline	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.	nulle.	peu.	partielle.

RÉACTION DE WASSERMANN AVEC LES ALBUMINES				
NOMS	CONTRÔLE double des albumines (1 c.c.)	COMPLÉMENT $q = 0,2$	COMPLÉMENT $q + 1/2\,p = 0,3$	Contrôles usuels de l'antigène et du système hémolytique sans faute.
Zo.. . . .	H. compl.	H. compl.	H. compl.	
De.. . . .	Id.	Id.	Id.	

L'on voit clairement la concordance presque absolue de la réaction produite par le sérum et de celle provoquée par sa globuline. Il y a pourtant une différence légère d'intensité, en ce sens que la globuline réagit un peu plus *faiblement* que le sérum complet. Je reviendrai sur l'explication possible de ce phénomène.

J'ai fait ces expériences avec 12 sérums et j'ai fixé les résultats par des diagrammes. Sur l'abscisse de ceux-ci figurent les doses de sérum ou de globuline, toujours en centimètres cubes de la dilution 1 : 5 du sérum ou de la dilution correspondante de la globuline. Sur l'ordonnée sont indiquées les gradations de l'hémolyse, que j'ai fixées toujours immédiatement à la fin du Wassermann, en comparant soigneusement les tubes contenant l'un une quantité donnée du sérum, l'autre la dose correspondante de la globuline.



N° 1. — Sérum V. H.

LÉGENDE DES DIAGRAMMES

La ligne ininterrompue indique toujours le sérum complet.

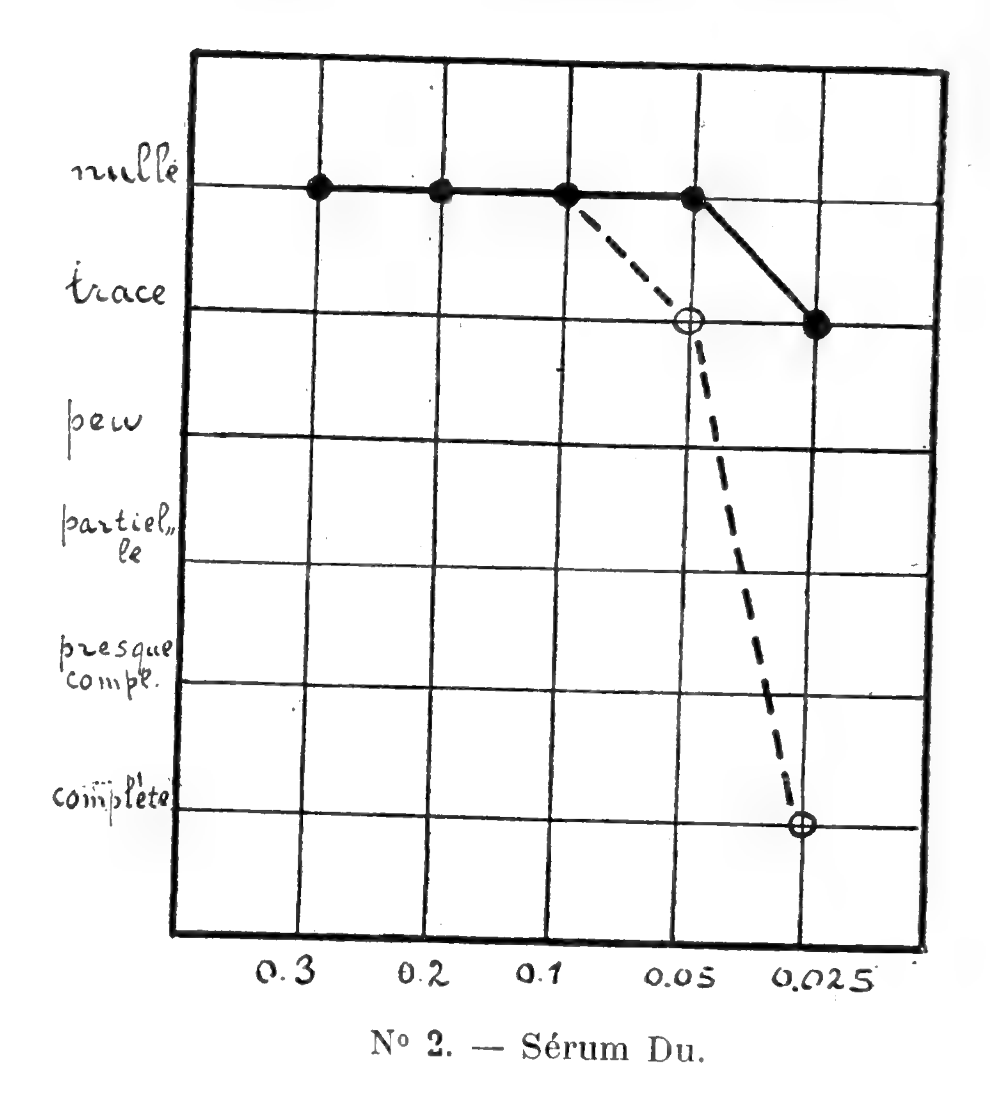
La ligne interrompue indique toujours la globuline.

Quand les lignes se recouvrent, seule l'ininterrompue a été dessinée.

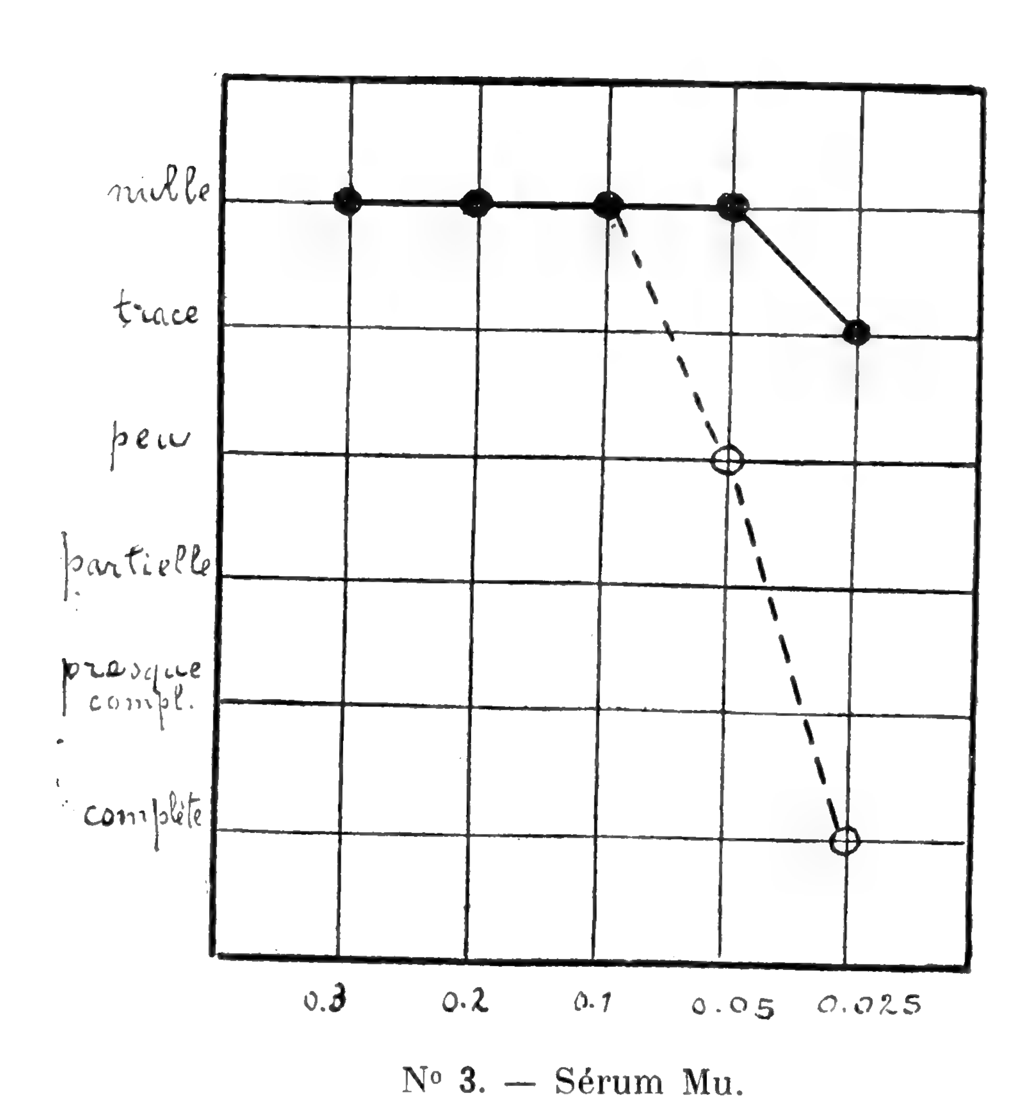
Les dates indiquent chaque fois le jour de la ponction veineuse, le jour du chauffage et le jour de l'exécution du Wassermann.

Entre ces derniers jours la dialyse a eu lieu :

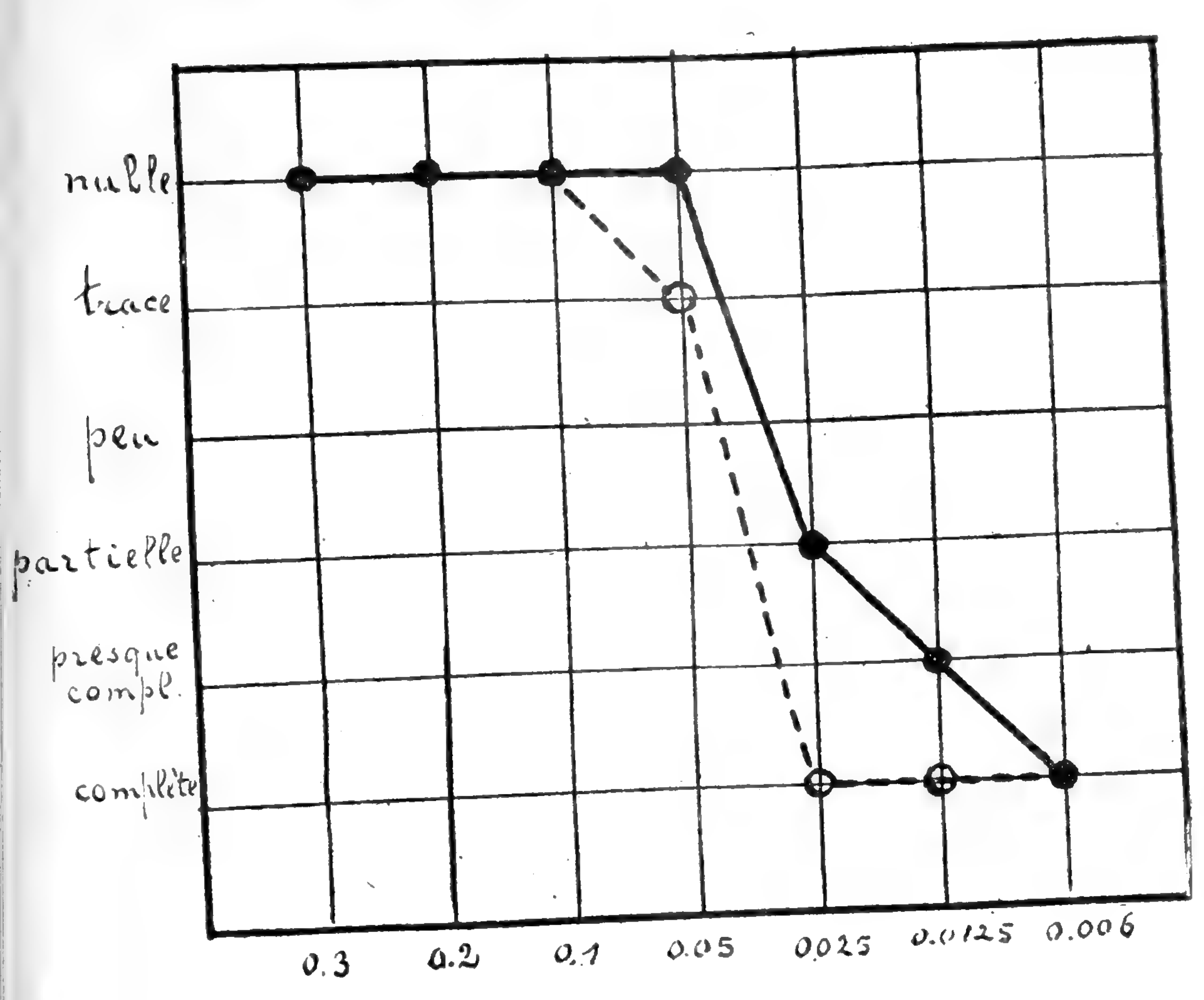
N° 1. — Sérum V. H. 9- 9-11 avril 1919, dialysé vingt-quatre heures.
N° 2. — — Du. 15-16-17 avril 1919, — vingt-quatre heures.
N° 3. — — Mu. 16-16-17 avril 1919, — vingt-quatre heures.
N° 4. — — T. V. 7- 8- 9 mai 1919, — vingt-quatre heures.
N° 5. — — Ko. 28-28-30 mai 1919, — vingt-cinq heures et demie.
(La globuline de ce sérum réagissait dans le contrôle double anticomplémentairement.)
N° 6. — Sérum Na. 26-26-27 juin 1919, dialysé vingt-quatre heures.
N° 7. — — Nie. 26-26-27 juin 1919, — vingt-quatre heures.
(Le contrôle double du sérum n'était pas complètement hémolysé.)
N° 8. — Sérum Zo. 2-2-4 juillet 1919, dialysé vingt-sept heures et demie.
(L'albumine aussi recherchée était absolument négative.)
N° 9. — Sérum De. (exactement comme n° 8).
N° 10. — — Zw. 16-17-18 juillet 1919, dialysé vingt-cinq heures.
(L'albumine aussi recherchée était absolument négative.)
N° 11. — Sérum de Vr. 24-25-26 juillet 1919, dialysé vingt-six heures.
N° 12. — — v. d. M. 24-25-26 juillet 1919 — vingt-six heures.



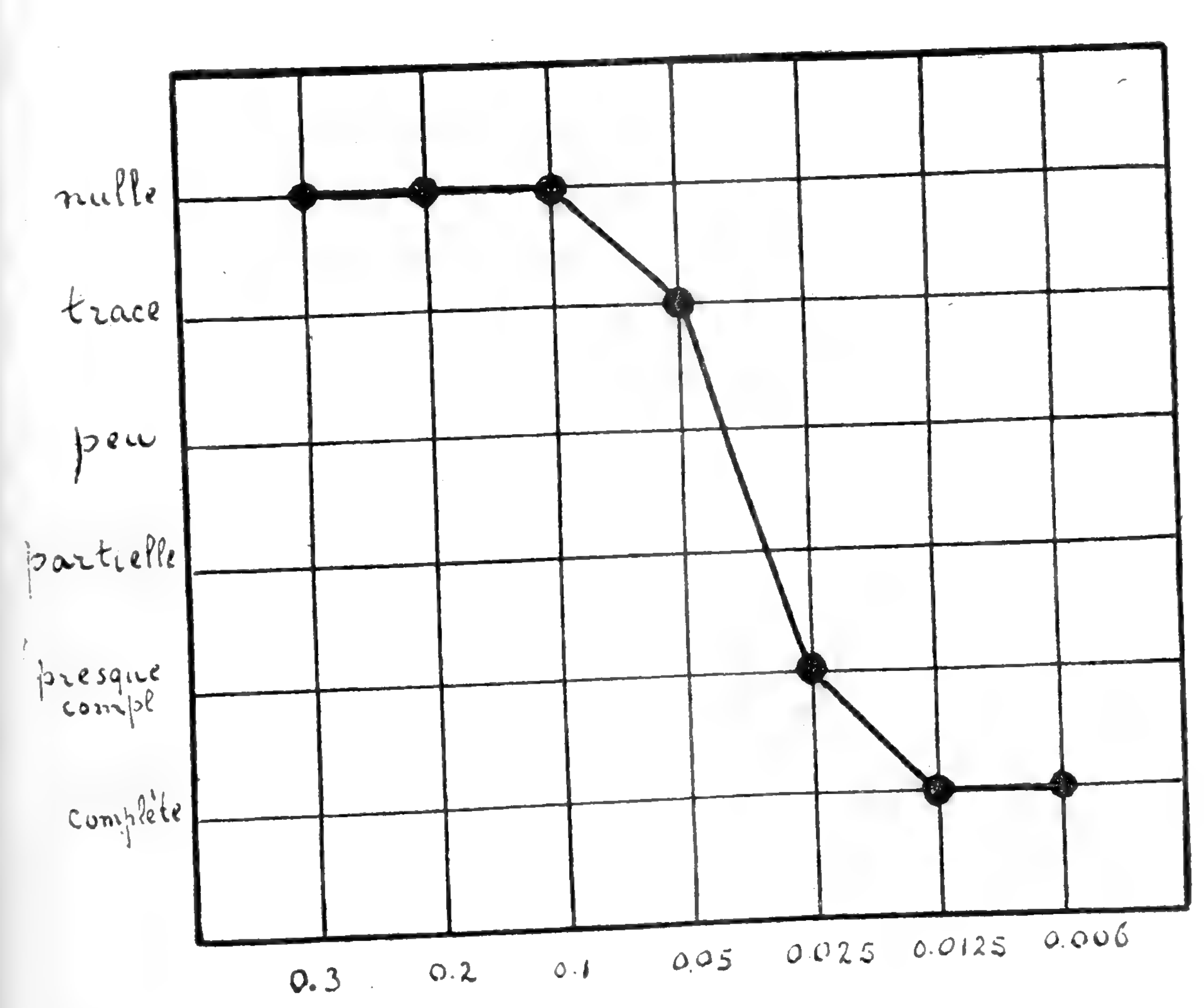
N° 2. — Sérum Du.



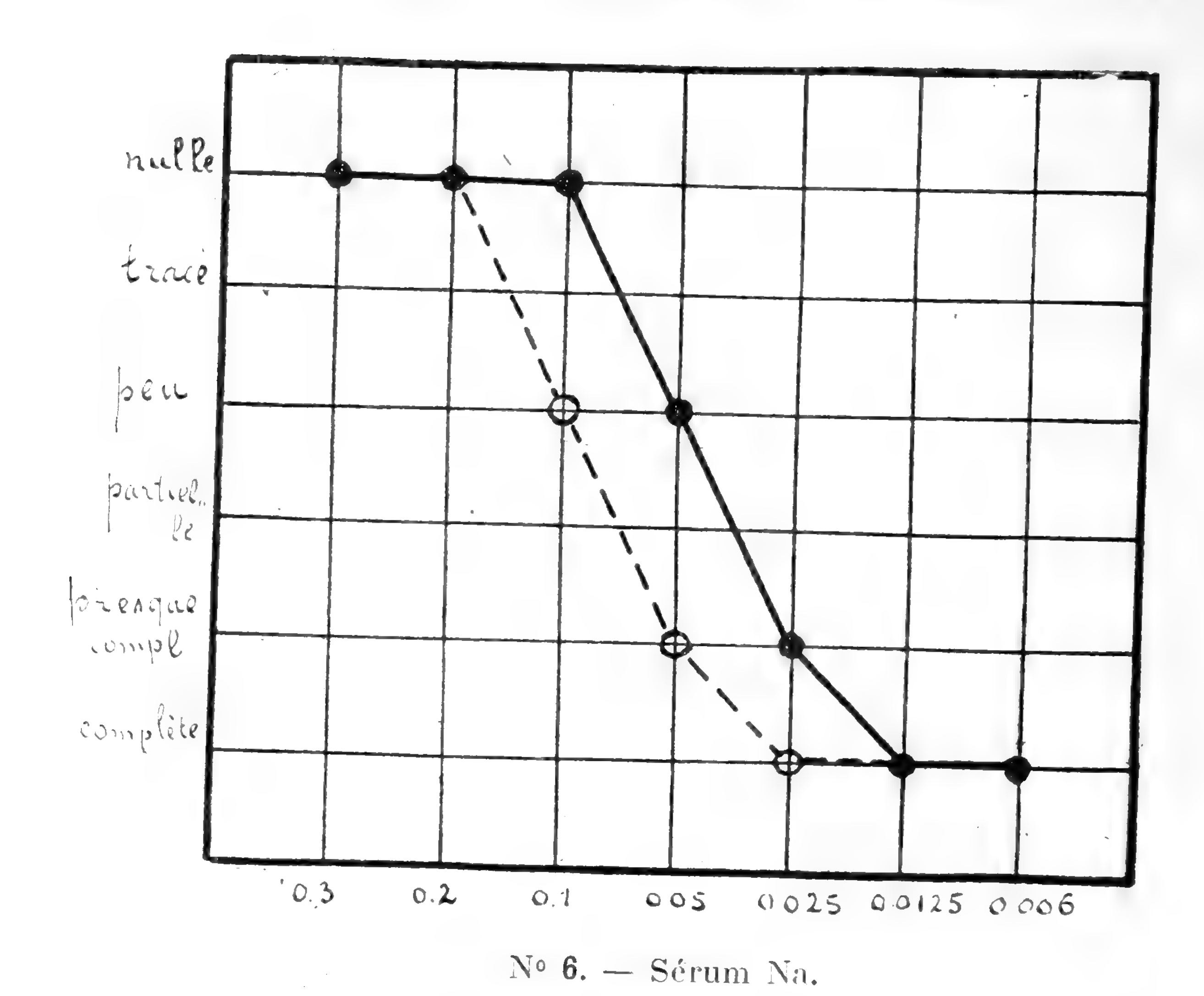
N° 3. — Sérum Mu.



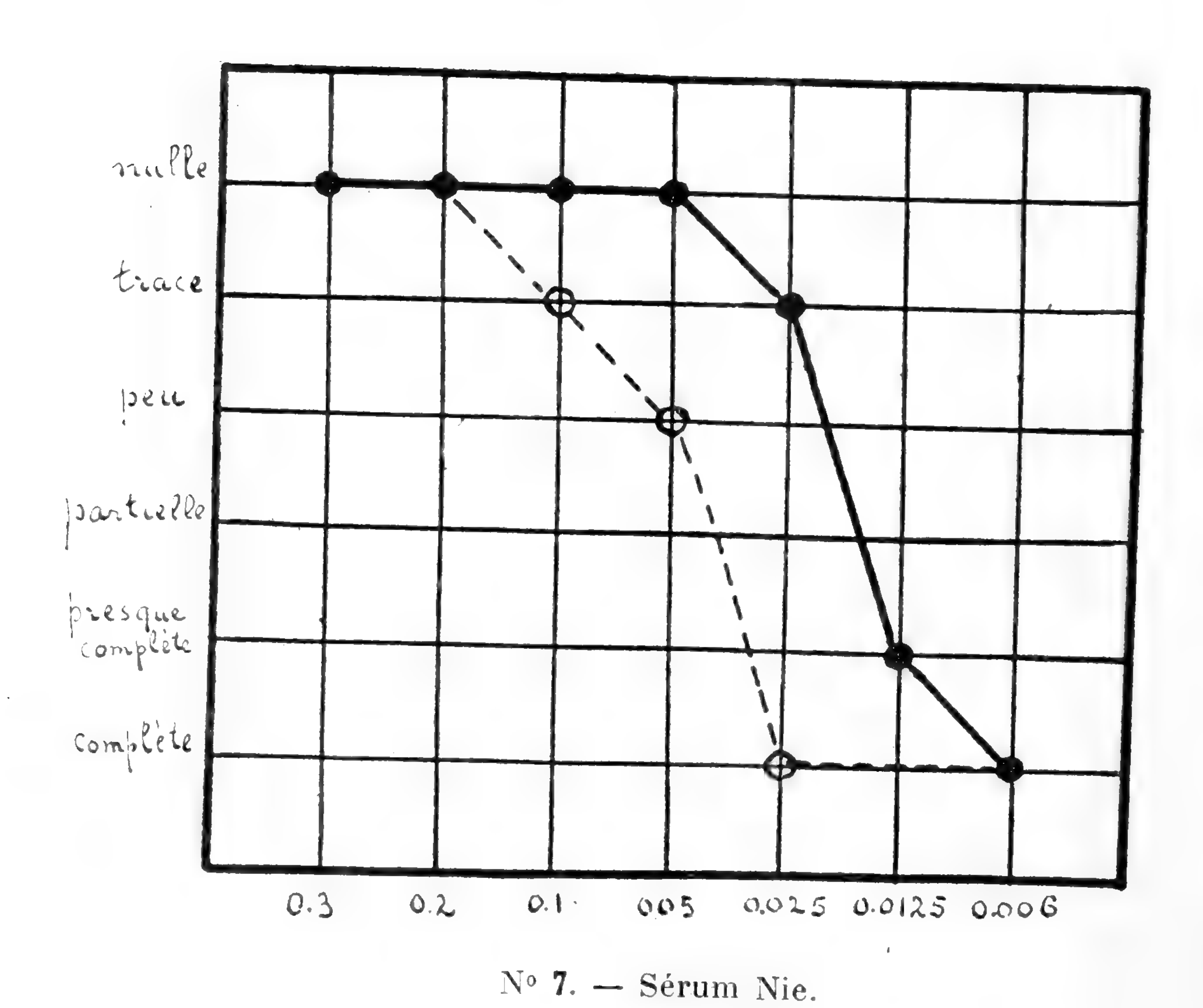
N° 4. — Sérum T. V.



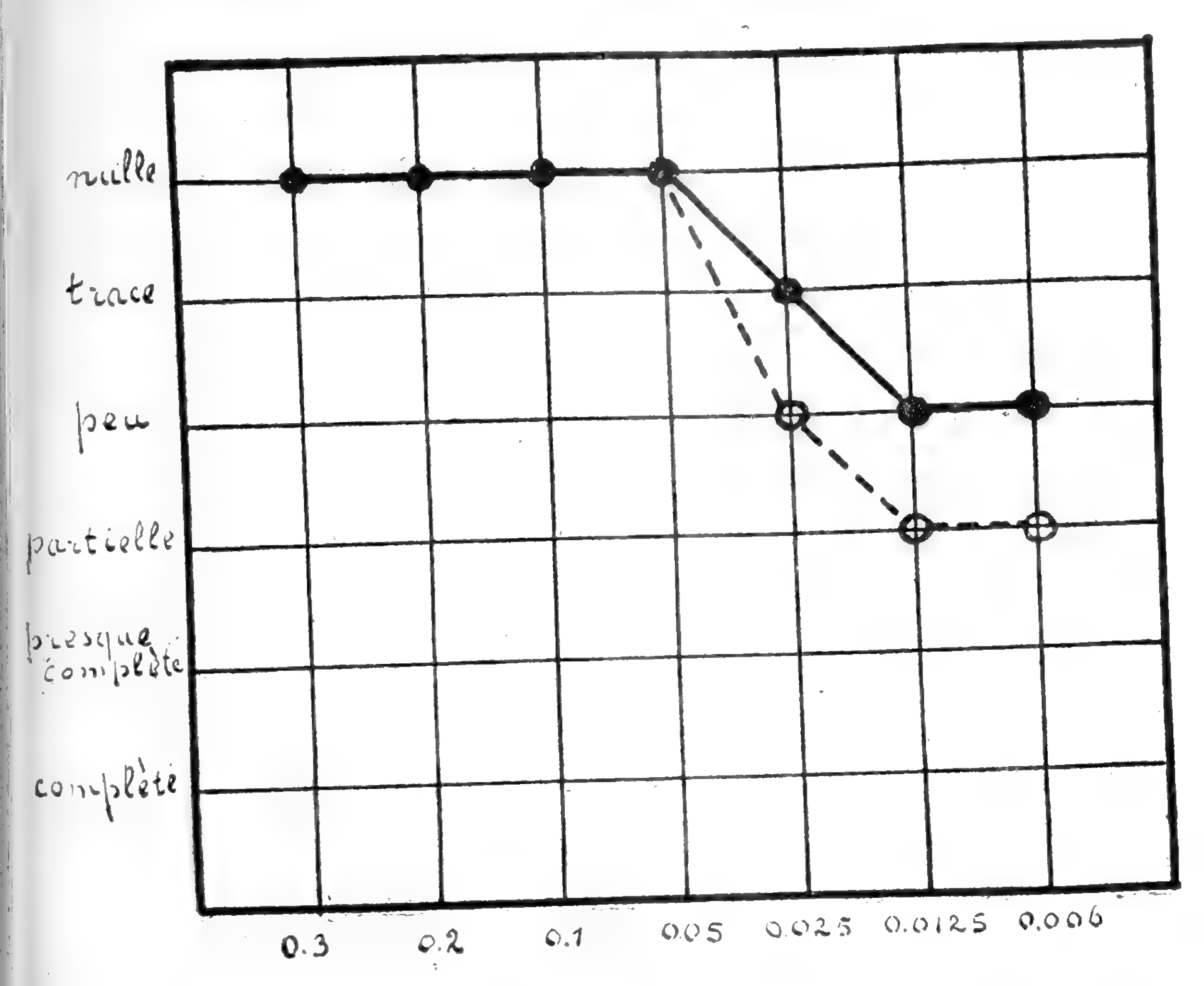
N° 5. — Sérum Ko.



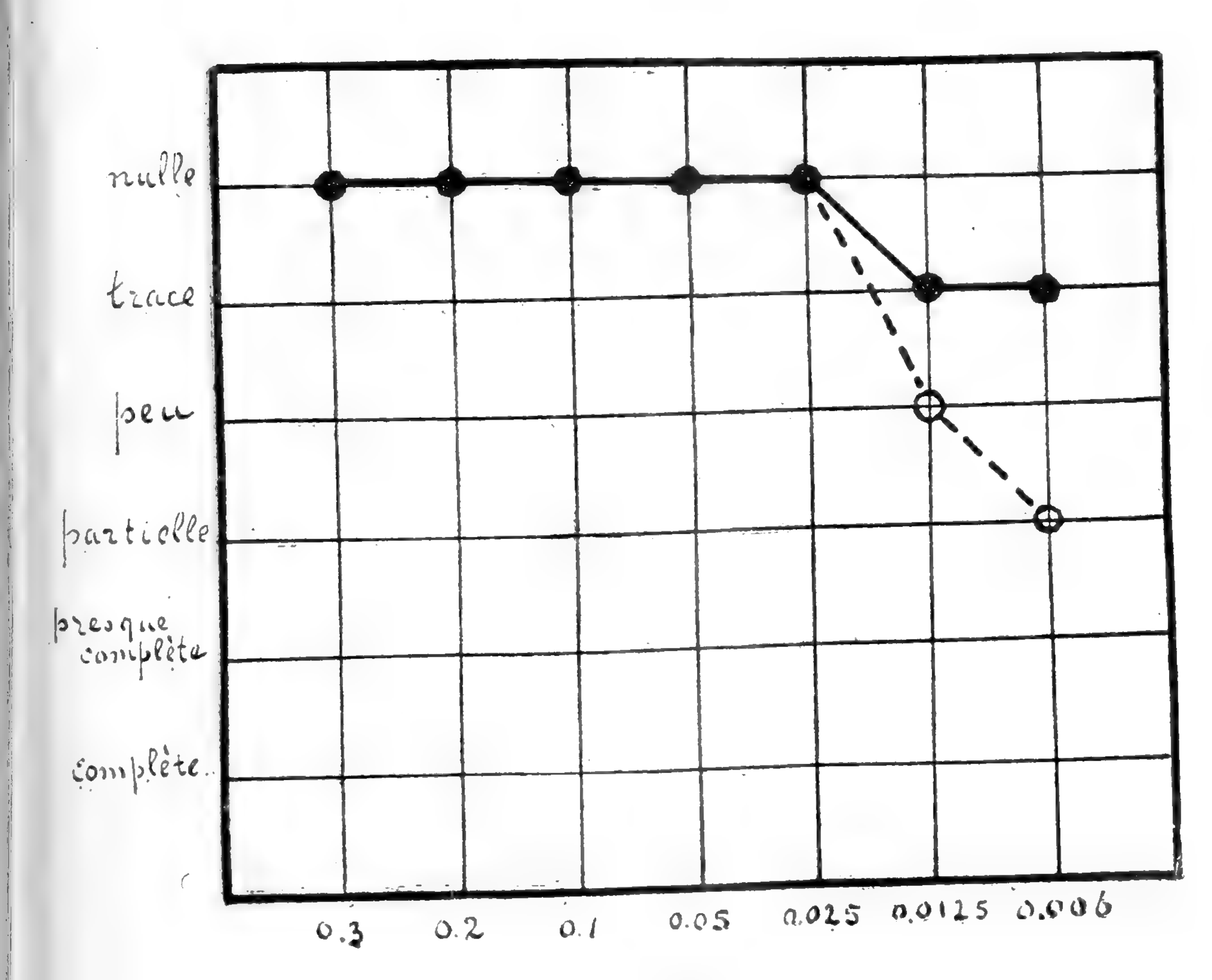
N° 6. — Sérum Na.



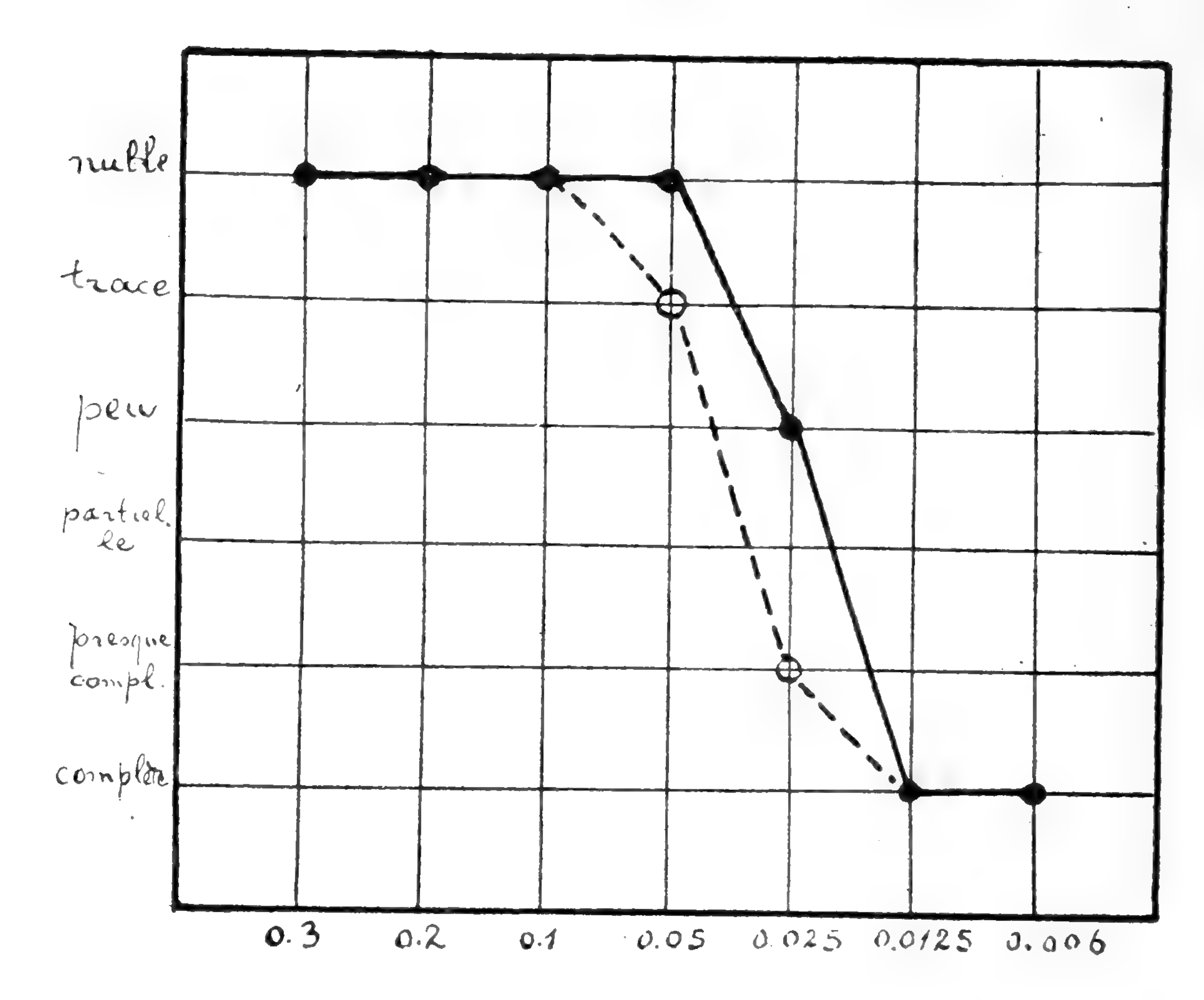
N° 7. — Sérum Nie.



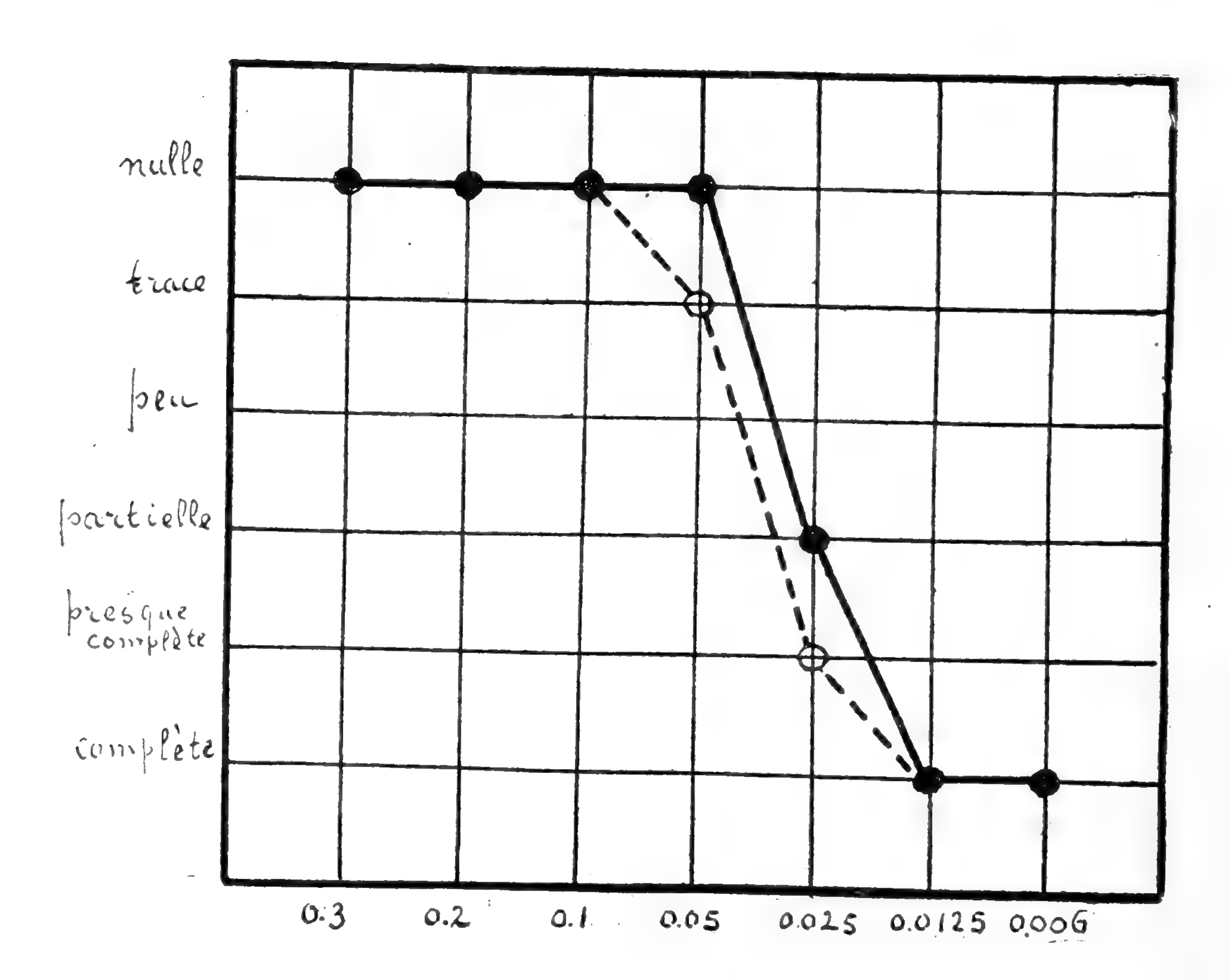
N° 8. — Sérum Zo.



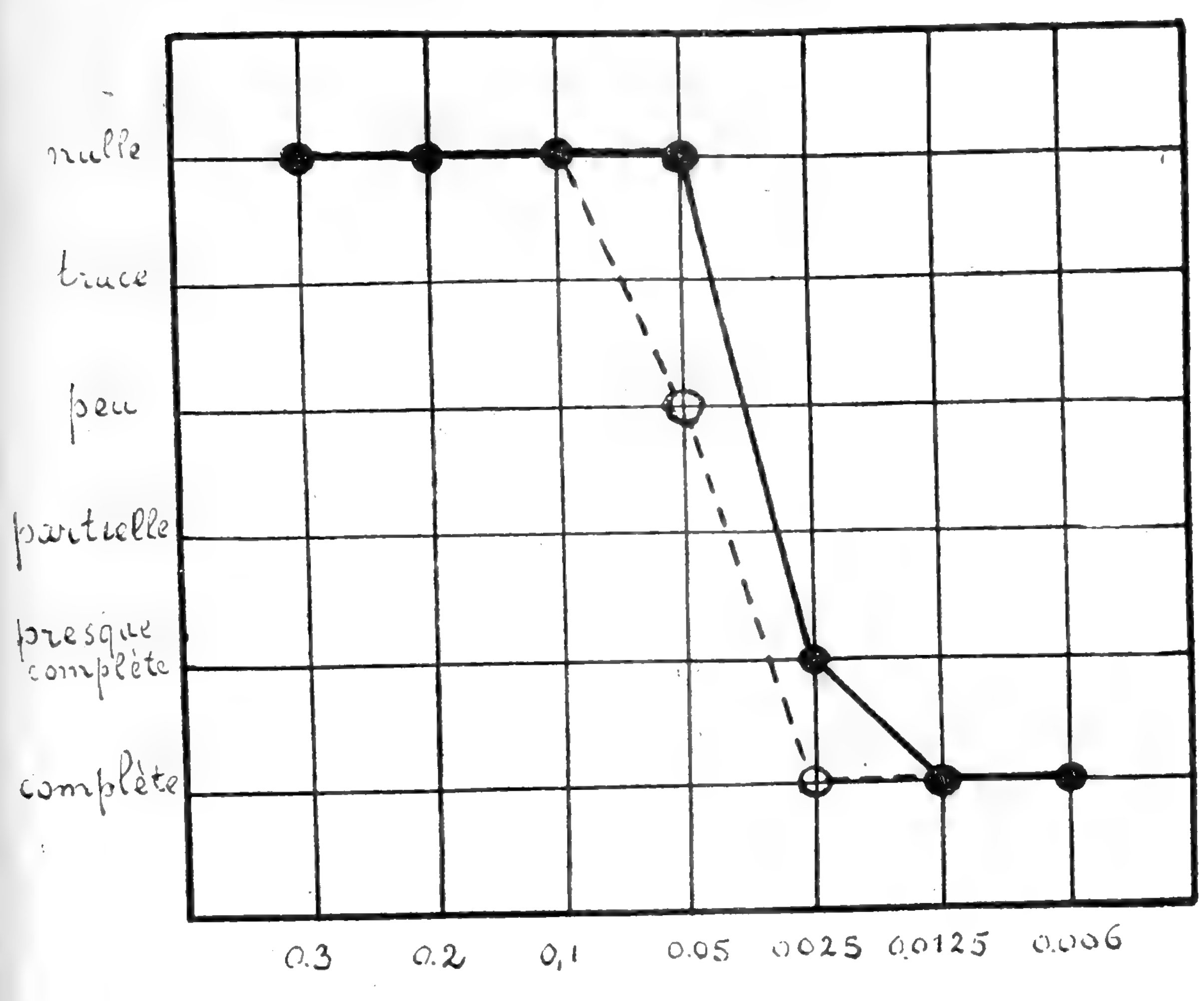
N° 9. — Sérum De.



N° 10. — Sérum Zw.



N° 11. — Sérum de Vr.



N° 12. — Sérum v. d. M.

Bien qu'un peu subjective, cette méthode suffit pleinement, parce qu'il ne s'agit pas de valeurs absolues, mais relatives. Pour les dénominations je me suis laissé guider par le schéma suivant :

(Hémolyse) *nulle* ;
Trace (d'hémolyse) : la suspension des hématies est devenue un peu transparente, pourtant à peine perceptible ;
Peu (d'hémolyse) : il y a une transparence bien perceptible, mais troublée encore distinctement ;
(Hémolyse) *partielle* : la transparence est nette, mais encore voilée ;
(Hémolyse) *presque complète* : en comparant ce tube avec un autre dans lequel l'hémolyse est complète, on aperçoit encore une opalescence légère ;
(Hémolyse) *complète*.

Il va sans dire que ces diagrammes ne prétendent à aucune valeur mathématique.

D'un coup d'œil on peut constater que la réaction produite par la globuline est d'une intensité toujours un peu plus faible que celle manifestée par le sérum complet. Il n'y a qu'une exception, indiquée dans le numéro 5 des diagrammes, où les réactions du sérum et de la globuline marchent parallèlement.

Seulement il est vraisemblable que cela est purement acci-

dentel et est favorisé par une action anticomplémentaire exceptionnellement grande de cette globuline, ainsi que le démontrait le contrôle double, qui n'était pas hémolysé suffisamment.

Or, en m'exerçant à ces expériences et en éliminant et en atténuant toutes les fautes de technique possibles, *j'ai réussi à obtenir des résultats qui démontrent* (*voir surtout les diagrammes n*[os] *8, 9, 10, 11 et 12*) *clairement que la relation entre la réaction de la globuline et celle du sérum complet est bien étroite.*

Pour cette raison je tends à admettre que la globuline, isolée du sérum, réagit avec la même intensité que le sérum complet.

Or la différence légère qui, malgré les soins les plus scrupuleux, n'a pu être supprimée entièrement, doit, à mon avis, être attribuée aux pertes inévitables de petites quantités de globuline, par suite du processus de dialyse : la globuline doit être transvasée trois fois ! D'autant plus que dans mes recherches avec le $Mg\ SO^4$ il a été démontré maintes fois qu'une quantité très minime de globuline positive est capable de provoquer une réaction bien appréciable et, par conséquent aussi, que la perte d'un peu de globuline peut influencer nettement l'intensité d'une réaction.

Cela admis, il faut envisager le fait que, dans les expériences où l'on pratique le Wassermann avec les doses de globuline en correspondance avec les doses *usuelles* du sérum, on peut observer souvent que la globuline réagit un peu plus fortement que le sérum.

Or, en faisant ressortir quelques détails des expériences, il me paraît bien facile de démontrer qu'il n'y a aucune contradiction véritable.

En premier lieu, il faut alléguer que l'alcalinité de la solution de globuline doit être nécessairement inférieure à celle du sérum. Elle est pratiquement nulle.

Les expériences de Sachs et Altmann ayant appris que l'alcali diminue la réaction de Wassermann, il n'y a plus rien de surprenant, qu'aux doses usuelles, la globuline réagisse un peu plus fortement, parce qu'elle en a moins que le sérum.

En diluant successivement les sérums, on obtiendrait un taux d'alcali qui n'est plus capable d'influencer l'intensité de la réaction.

En second lieu, on peut observer facilement que presque chaque solution de globuline a une action anticomplémentaire légèrement supérieure à celle du sérum ou de son albumine. Tous les contrôles-doubles des globulines (bien entendu quand elles ne sont pas tellement anticomplémentaires, qu'elles ne peuvent pas être utilisées pour le Wassermann) montrent, déjà avant la fin du Wassermann, une hémolyse complète; pourtant on peut remarquer que les hématies en contact avec la globuline sont dissoutes en dernier lieu, tandis que celles en contact avec l'albumine sont hémolysées les premières et que le sérum tient le milieu.

Cette action anticomplémentaire, légère qu'elle est, est annulée entièrement dans les dilutions.

Quant aux sérums *négatifs*, l'expérience a démontré, avec une certitude absolue, que leur *albumine* réagissait toujours négativement.

Leurs globulines produisent aussi une réaction négative, mais — chose remarquable — avec des exceptions.

Il y en a qui ont un caractère positif vis-à-vis du Wassermann. Or, l'intensité d'une semblable réaction a toujours été inférieure à celle produite par une globuline d'un sérum positif. La dernière aboutit souvent à la déviation complète de l'alexine, ce qui n'a pas été observé avec la globuline d'un sérum négatif.

Comment expliquer cette particularité ?

A mon avis, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Ainsi, parmi ces globulines « positives » il y en a une, Vi, qui provient du sérum d'un ancien syphilitique, traité par le salvarsan. Or les recherches ont démontré que la globuline d'un sérum positif, à la dose usuelle, peut réagir plus fortement que le sérum complet, probablement par la disparition des substances alcalines.

Il est donc possible que, quoique le sérum ne puisse que produire une réaction négative, la globuline réagisse encore dans ces circonstances avec une intensité faible.

Pourtant, j'ai étudié une série de sérums négatifs, les n°s 27 jusqu'à 34 provenant de personnes chez lesquelles une infection syphilitique pouvait être exclue avec grande vraisemblance. Parmi eux, il y en a un (Rh.) qui a fourni une glo-

buline, réagissant faiblement, mais positivement. D'ailleurs j'ai examiné deux fois, à des périodes diverses, le sérum d'un même individu (Cr.). La première fois (n° 14) la globuline s'est montrée faiblement positive, tandis que la réaction a été entièrement négative lors de la deuxième analyse (n° 27). Cette réaction différente de la globuline d'une même personne est-elle la suite d'une altération de cette substance, causée par un processus quelconque, qui se serait passé *dans* l'organisme, ou bien s'est-elle produite *en dehors* de l'organisme grâce à des influences qui ont agi sur elle pendant les manipulations depuis la ponction veineuse jusqu'à l'exécution du Wassermann? La première supposition me paraît être la plus vraisemblable.

Il est remarquable que la séparation au moyen du sulfate de magnésium n'ait fourni *aucune* globuline « positive », provenant d'un sérum négatif. On pourrait peut-être suspecter le sulfate d'ammonium d'être en cause. Mais alors pourquoi la majorité des globulines des sérums négatifs n'est-elle pas influencée par lui? Je crois que l'influence du sulfate d'ammonium peut seulement se résumer dans le fait qu'il précipite la totalité de la globuline, et que, grâce à cette particularité, une légère altération de la globuline, déjà existante dans l'organisme, est distinctement mise au jour. Il faut se souvenir que la globuline des sérums négatifs a aussi une action anticomplémentaire légère et que, de plus, l'alcali y faisant défaut, elle peut donner une réaction de Wassermann telle que les sérums normaux démontrent avec des doses très fortes. La globuline positive provenant d'un sérum négatif est cependant une *exception*. Son existence est assez intéressante pour provoquer de nouvelles recherches.

Résumant les résultats de mes recherches, j'aboutis aux conclusions suivantes :

1° Dans un sérum *positif*, c'est la *globuline* qui est responsable de la réaction de Wassermann positive, tandis que l'albumine réagit tout à fait négativement (1).

(1) Dans un travail qui vient de paraître dans le *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, n° 29, fasc. 5, MM. W. Gloor et R. Klinger (de Zürich) aboutissent à une autre conclusion. D'après ces savants, un sérum d'un syphilitique réagirait

2° En comparant l'intensité de la réaction du sérum avec celle de la globuline isolée, l'expérience conduit à admettre qu'elles sont les mêmes ; cependant avec les doses usuelles on peut remarquer que la globuline réagit souvent un peu plus fortement, sans doute à cause des conditions décrites de l'expérience.

3° La globuline provenant d'un sérum *négatif* réagit en règle générale *négativement*. Elle peut cependant produire des réactions plus ou moins positives. La cause n'en est pas encore bien connue, mais il est vraisemblable que la globuline dans ces cas avait acquis cette propriété dans l'organisme.

4° Il y a des influences extérieures, microbiennes peut-être, qui peuvent rendre une globuline anticomplémentaire et qui peuvent transformer une globuline négative en une globuline plus ou moins positive.

5° L'albumine d'un sérum négatif réagit toujours négativement, même quand la globuline, sous des influences extérieures, est devenue anticomplémentaire ou encore positive.

6° Comme conclusion, d'une signification secondaire, mais non dénuée d'intérêt, je me crois autorisé à signaler que la méthode de Denis-Hammersten ne précipite pas toute la quantité de globuline du sérum humain, tandis que la méthode de Kauder-Hofmeister — d'ailleurs plus simple — le fait complètement.

Aperçu des résultats et inductions.

En considérant la totalité des résultats obtenus, les questions suivantes se posent tout naturellement :

D'où provient la conduite particulière d'une globuline posi-

encore positivement, quand il est débarrassé de sa globuline. La controverse avec mes recherches n'existe pourtant qu'en apparence, car dans les expériences des auteurs nommés, les sérums ne furent pas *pleinement* débarrassés de globuline. De mes expérimentations avec le sulfate de magnésium, il résulte clairement qu'une quantité *minime* de globuline, restant dans l'albumine, suffit pour provoquer un Wassermann distinctement positif. Cette quantité de globuline n'appartient naturellement pas aux globulines, dites labiles. Or, je suis d'avis qu'on doit être très prudent en divisant les globulines d'après leur labilité.

Dans mon travail, je n'ai pas pris parti dans la question de l'unité ou de la pluralité des globulines. Je me suis placé au point de vue de Denis-Hammersten seulement pour simplifier les expériences à entreprendre. Cependant, il faut admettre que celles-ci n'ont pas plaidé pour la pluralité des globulines.

tive ? En quoi diffère-t-elle d'une globuline négative? La première contient-elle un anticorps, vis-à-vis de l'antigène et l'a-t-elle adsorbé pendant qu'elle passa de l'état de solution colloïdale à l'état floconneux? Ou bien avait-elle déjà adsorbé une telle substance avant qu'elle fût précipitée ? Ou bien encore, a-t-elle elle-même subi, à la suite de l'infection syphilitique ou d'une autre infection rendant le sérum positif à la réaction de Wassermann, une altération chimique, physique ou chimico-physique, grâce à laquelle elle est douée de la propriété de dévier le complément à l'aide d'un antigène convenable ?

Ce sont là des problèmes des plus intéressants.

A mon avis, il est le plus vraisemblable, qu'*en supposant* que la globuline ait en effet adsorbé une substance hypothétique, ce processus a déjà eu lieu dans l'organisme. En admettant que l'adsorption se soit passée au moment où la globuline se précipitait, il faut aussi admettre que la substance adsorbée était libre dans le sérum et, en tout cas, qu'elle est facilement adsorbée par une matière lui offrant une grande surface.

Les expériences avec le $MgSO^4$ ont appris qu'il en est autrement. La méthode de Denis-Hammersten, bien qu'elle ne soit assez efficace pour séparer du sérum la globuline, de façon que l'albumine devienne négative, en laisse seulement des quantités minimes dans l'albumine. La quantité de globuline précipitée est pourtant assez grande pour pouvoir adsorber entièrement la substance hypothétique libre. L'albumine ne réagit encore positivement que grâce à la quantité minime de *globuline* qu'elle contient.

Aussi est-il remarquable que les substances, qui ont une grande capacité d'adsorption, ne sont pas capables de rendre négatif un sérum qui est positif.

Je rappelle que Wechselmann se sert d'une suspension de $BaSO^4$ pour entraîner une complémentoïde supposée d'un sérum. Or, cette substance ne diminue pas l'intensité de la réaction. Au contraire elle paraît la rendre plus forte (1).

(1) Noguchi a décelé que le $BaSO^4$. diminue l'intensité du Wassermann quand on le mélange avec une dilution forte du sérum.

Or, dans ces circonstances, c'est la globuline qui peut être adsorbée elle-même.

Voir aussi Wolf, *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, **11**, p. 154.

Pour ma part j'ai expérimenté avec le kaolin et avec un charbon, doué d'une faculté d'adsorption notable (connu en thérapeutique sous le nom commercial de « norit »). J'ai fait plusieurs expériences en exécutant à la fois le Wassermann avec un sérum positif et avec le même sérum, traité par une grande quantité de kaolin ou de charbon et je n'ai pas réussi à rendre le sérum négatif. Les contrôles avec des sérums négatifs démontraient que ces substances ne provoquaient pas un Wassermann positif.

Il me paraît superflu de donner tous les protocoles. Qu'il me soit seulement permis de reproduire une expérience dans laquelle j'ai recherché si les adsorbants nommés produisaient peut-être une diminution de l'intensité de la réaction.

Protocole VIII. — Le sérum S (ponction veineuse le 30 septembre 1919, inactivé le 31), est, chaque fois, à la dose de 2 cent. cubes mélangé avec une grande quantité de kaolin ou du charbon. Les volumes de ses substances sont choisis d'une telle façon, que leurs précipités, obtenus après la centrifugation, surpassent le volume de la globuline qui serait précipité au moyen du $MgSO_4$ ou du $(NH_4)_2SO_4$.

On laisse les mélanges pendant une heure à la température de la chambre et on centrifuge jusqu'à clarté complète du sérum surnageant (contrôlé dans le microscope à fond noir).

Les sérums sont aspirés et on fait des Wassermann comparatifs, comme il a été décrit auparavant pour le sérum et sa globuline.

Le résultat est indiqué dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII.

NOMS	CONTRÔLES doubles des sérums 1 c.c.	DOSES DES SÉRUMS						
		0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,006
S (charbon)..	H. compl.	Nulle.	Nulle.	Nulle.	Peu.	Compl.	Compl.	Compl.
S (kaolin) . .	H. compl.	Nulle.	Nulle.	Nulle.	Peu.	Compl.	Compl.	Compl.
S (pas traité.)	H. compl.	Nulle.	Nulle.	Nulle.	Peu.	Compl.	Compl.	Compl.
Contrôles usuels sans faute.								

On voit clairement, qu'il n'y a aucune différence. Ces expériences, bien que ne constituant pas une preuve absolue, parce

qu'on peut alléguer le pouvoir adsorbant différent de la globuline, en comparaison avec les autres adsorbants, ne sont pourtant pas en faveur de la supposition d'une substance libre dans le sérum.

De toutes ces considérations il est bien vraisemblable que la globuline positive, en supposant qu'elle ait adsorbé une substance quelconque, l'a fait déjà avant la séparation.

Alors il faut envisager la question : cette substance hypothétique est-elle un anticorps vis-à-vis de l'antigène?

Mes recherches ne sont pas capables de donner une réponse décisive, mais il faut remarquer qu'elles plaident pour le contraire.

Dans l'essentiel de la réaction de Wassermann, il n'y a rien qui démontre avec certitude, même avec vraisemblance, l'action d'un anticorps. Or les expériences, installées pour obtenir un sérum comparable à un sérum d'un syphilitique, en injectant un extrait alcoolique (privé d'abord d'alcool), n'ont jamais fourni un résultat appréciable. Et le caractère particulier des divers antigènes ne cadre pas avec la conception d'un anticorps.

Au contraire : la réaction de Wassermann s'impose comme se basant sur un processus purement physique ou chimico-physique.

Or, il n'y a rien de surprenant dans la supposition, que la globuline positive ait acquis sa propriété différente *par l'adsorption d'une substance, chimiquement, physiquement ou chimico-physiquement bien déterminée.*

De plus : la globuline qui a adsorbé énergiquement une telle substance, peut-être un produit supérieur de la désagrégation des albuminoïdes ou une substance lipoïde, *doit* réagir autrement qu'une globuline normale, mais il sera très difficile *de différencier la globuline qui a adsorbé énergiquement une telle substance d'une globuline qui a subi des altérations dans sa composition moléculaire propre, sans l'adsorption d'une substance quelconque*, altérations procurant les particularités qui caractérisent la globuline positive.

Pour le moment la décision entre ces deux éventualités a cependant une valeur secondaire, parce que ces deux reviennent pratiquement chacune à *la globuline altérée d'une façon*

déterminée, dite spécifique, et par cela devenue positive, sous l'influence d'une infection spéciale, le plus souvent de la syphilis.

Pour soutenir cette hypothèse, je puis alléguer quelques arguments plus ou moins démonstratifs.

Premièrement, l'observation qu'une globuline (et pas l'albumine) sous des influences extérieures (le plus souvent bactériennes) peut donner la réaction de Wassermann, comme mes expériences avec la dialyse prolongée l'ont décelé et comme Craig (1) et d'autres l'ont démontré pour le sérum complet.

Ensuite, les phénomènes de précipitation que présentent les sérums positifs sous l'influence de certains lipoïdes fixent, comme nous l'avons déjà remarqué dans l'introduction de ce mémoire, l'attention sur une globuline altérée qui produit des précipités en précipitant elle-même ou en causant la précipitation des lipoïdes.

En dernier lieu on pourrait interpréter les observations de Sachs et Altmann, déjà citées auparavant, à savoir : que l'alcali diminue l'intensité de la réaction, tandis que l'acide fait le contraire, de cette façon, que ces phénomènes reposent sur le fait que l'alcali réagit contre l'agrégation des molécules de la globuline, tandis que l'acide la favorise.

Toutes les suppositions et hypothèses que j'ai associées aux résultats de mes recherches conduisent nécessairement à des expériences ultérieures, dont le but sera d'étudier la différence qui existe entre une globuline réagissant positivement et une globuline réagissant négativement. Pour ces expériences la technique de dialyse décrite au commencement de ce travail pourra rendre de bons services.

Je crois que de telles recherches seront d'autant plus productives, qu'elles seront entreprises sous l'influence de l'*hypothèse du travail*, que les sérums réagissant positivement doivent cette propriété seulement à leur globuline, laquelle a subi une altération déterminée, soit par l'adsorption d'une substance bien définie, soit par un changement déterminé de sa composition moléculaire propre.

(1) *Journ. of expér. méd.*, **13**, 1911, p. 521.

ERRATUM

Dans le tableau V, Epreuve préparatoire, dans les colonnes indiquées par 3 et 4, les chiffres 0,2 et 0,3 indiquant les quantités de liquide physiologique, doivent être remplacés par 0,7 et 0,8,

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Novembre — N° 11.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX



PARIS

MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XV[e])

Les annonces sont reçues à l'Économat de l'Institut Pasteur.

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : 45 francs; UNION POSTALE : 55 francs. PRIX D'UN NUMÉRO : 4 francs.

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES ».

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . . FRANCE . . . . 45 fr.
— — — — . . . . . . UNION POSTALE. 55 fr.
Prix du numéro, — — . . . . 4 fr.

Années antérieures. — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées. Les années 1892 et 1897 à 1919 se vendent séparément **28** francs.
Les années 1920 et 1921 se vendent chacune **45** francs.
Les années 1887 (tome I), 1893 (tome VII), étant très rares, ne se vendent qu'avec collection complète et au prix de **100** francs chacune.
TABLES DES MATIÈRES, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

SOMMAIRE DU N° 11

MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR. — **Histoire d'une idée. L'ŒUVRE DE E. METCHNIKOFF** (*Embryogénie. Inflammation. Immunité. Sénescence. Pathologie. Philosophie*), par A. BESREDKA, professeur à l'Institut Pasteur.
Paris, Masson et Cie, 1921, 135 pages. . . . . 6 fr. *net*

P. LEQUEUX*, Ingénieur des Arts et Manufactures

Maison WIESNEGG, 64, rue Gay-Lussac, Paris

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de médecine de Paris

STÉRILISATEURS, ÉTUVES, APPAREILS DE DÉSINFECTION

Installations de Laboratoires de bactériologie.

Exposition univ. Paris 1900 : DEUX GRANDS PRIX

ÉTABLISSEMENTS GONIN

Produits, Procédés
et
APPAREILS
pour la
DÉSINFECTION
en surface, en profondeur
et par lavages
ou trempages.



APPROUVÉS
par le
Conseil supérieur
d'Hygiène publique
de France,
AUTORISÉS
conformément à la loi
par M. le Ministre
de l'Intérieur.



FUMIGATORS GONIN

N° 3 pour 15 m³
N° 4 pour 20 m³

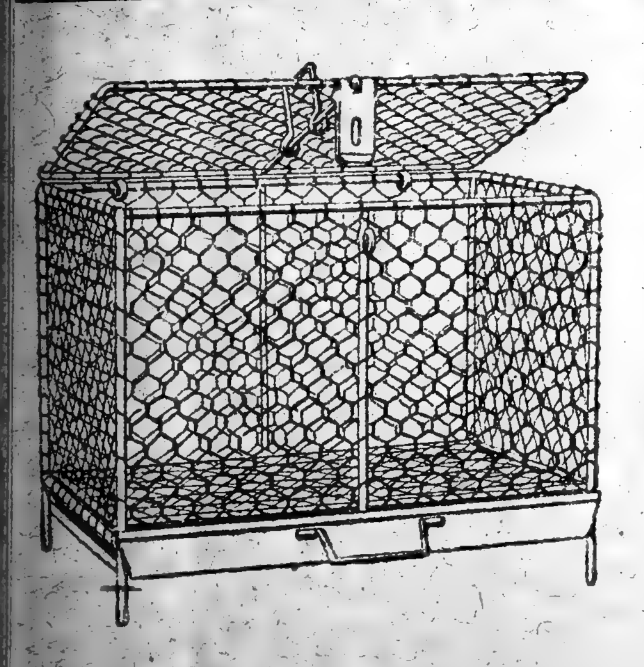
Cartouches auto-productrices d'aldéhyde formique

CRESYLOL SODIQUE GONIN — FLUOFORMOL GONIN
NITIDOL GONIN

ÉTUVES de tous chauffages, fixes et transportables, à basse température, sans pression, utilisant le formol.

Adresser toute la correspondance
à M. le Directeur des Etablissements GONIN
60, Rue Saussure, PARIS (17e)

Adresse télégr. : FUMIGATOR-PARIS
Téléph. : WAGRAM 17-23



FABRIQUE DE GRILLAGES
ET DE CAGES
pour Études Bactériologiques

CHENILS ET VOLIÈRES

PAUL PIARRETTE

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine

17, rue Séguier, 17, Paris (6e)

35e ANNÉE NOVEMBRE 1921 N° 11

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR UNE CURIEUSE MODIFICATION DE L'AMYGDALINASE ET DE L'AMYGDALASE DUE AU VIEILLISSEMENT

par MM. Gabriel BERTRAND et Arthur COMPTON.

On sait que les préparations diastasiques perdent peu à peu leur activité sous l'influence du temps, même lorsqu'on les conserve en vases clos et à l'abri de la lumière. Quelquefois, cette perte est assez rapide et devient complète en quelques mois, comme avec la tyrosinase du son et surtout la pectase de la luzerne; d'autres fois, au contraire, elle est très lente et se poursuit durant des années, comme avec l'émulsine des amandes et la laccase de l'arbre à laque. Mais on ignore les autres modifications qui accompagnent le vieillissement des préparations diastasiques, on ne sait rien du mécanisme de ce phénomène général.

Nous avons observé, en étudiant d'une façon minutieuse les conditions d'activité des diastases retirées des amandes, un fait nouveau et vraiment curieux, dû au vieillissement : c'est le changement de la réaction optimale, c'est-à-dire de la concentration en ions hydrogène la plus favorable à l'action diastasique.

Au cours des recherches comparatives que nous avons publiées sur les diastases qui se trouvent réunies dans la

préparation d'amandes habituellement appelée *émulsine*, nous avons déjà signalé que l'amygdalinase et l'amygdalase atteignaient leur maximum d'activité dans un milieu nettement alcalin à la phtaléine du phénol (1).

Nous nous étions servis d'une préparation datant de quelques mois qui donnait avec l'eau, comme presque toutes les préparations diastasiques, une solution alcaline à l'hélianthine et acide à la phtaléine. A la concentration de 5 milligrammes dans 4 cent. cubes, la réaction, évaluée suivant Sörensen (2), par la méthode colorimétrique au p-nitrophénol, équivalait à une teneur en ions hydrogène de $10^{-6,3}$.

En faisant agir 5 milligrammes de cette préparation diastasique sur 0 gr. 622 d'amygdaline en présence de quantités variables de soude ou d'acide sulfurique, le volume total du liquide étant amené à 33 cent. cubes, nous avons trouvé, après deux heures d'action à la température de + 57°, les proportions suivantes de glucoside dédoublé, d'après le dosage de l'acide cyanhydrique :

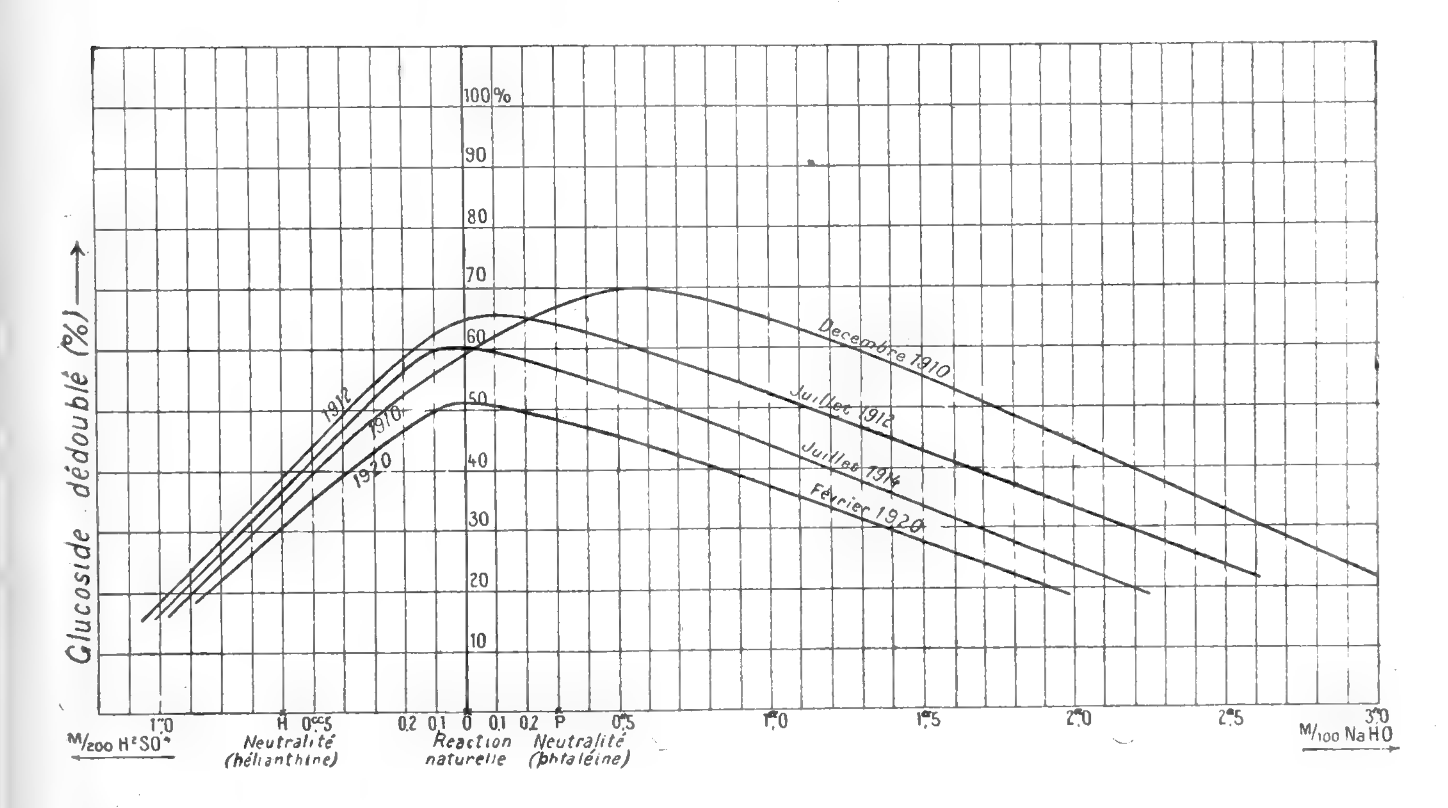
TABLEAU I

QUANTITÉS D'ACIDE OU DE SOUDE ajoutées dans chaque expérience	POURCENTAGES D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉE					
c.c. —	Exp. I	II	III	IV	V	VI
0,7 SO^4H^2 N/100.	31,3	»	»	»	»	»
0,6 — — (réaction neutre à l'hélianthine). .	manque	»	»	»	»	»
0,5 — —	42,0	»	»	»	»	»
0,3 — —	49,4	»	»	»	»	»
0,1 — —	56,0	»	»	»	»	»
0,0 (réaction naturelle)	57,9	56,0	59,2	58,4	57,9	58,4
0,1 NaOH N/100.	62,5	»	»	»	»	»
0,2 — —	»	64,2	»	»	»	»
0,3 — — (réaction neutre à la phtaléine). .	»	»	66,7	»	66,7	»
0,4 — —	»	67,5	»	»	»	»
0,6 — —	»	70,8	»	»	»	»
0,7 — —	»	»	»	67,5	»	»
0,8 — —	»	66,7	»	»	»	»
0,9 — —	»	»	»	65,8	65,8	»
1,0 — —	»	63,4	»	»	»	»
1,2 — —	»	»	»	62,5	»	»
1,3 — —	»	»	»	»	61,7	»

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, **153**, p. 360, 1911.
(2) *C. R. des travaux du laboratoire de Carlsberg*, **8**, p. 1 et 191, 1909.

QUANTITÉS D'ACIDE OU DE SOUDE ajoutées dans chaque expérience	POURCENTAGES D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉE					
	Exp. I	II	III	IV	V	VI
c.c. —	—	—	—	—	—	—
1,4 — —	»	»	»	57,9	»	»
1,5 — —	»	»	»	»	»	56,8
1,6 — —	»	»	54,3	»	56,0	»
1,7 — —	»	»	51,8	»	»	»
1,8 — —	»	»	48,6	»	»	»
3,0 — —	»	»	»	22,2	»	»
3,4 — —	»	»	»	»	»	7,4
3,6 — —	»	»	»	»	»	0,0

Afin d'obtenir des résultats aussi comparables que possible, au moins dans chaque série d'expériences, la diastase a été



dissoute une demi-heure d'avance, à raison de 50 milligrammes dans 20 cent. cubes d'eau, et, au moment de s'en servir, on a mesuré exactement 2 cent. cubes de la solution avec une pipette fine; en outre, chaque mélange d'émulsine et de glucoside a été préparé un quart d'heure après l'autre, de manière à permettre plus tard les dosages tout en respectant l'égale durée de la réaction diastasique (1). Nous ne nous sommes servis que d'eau très pure, redistillée dans le vide à l'aide d'un appareil en verre. Enfin les ballons contenant les mélanges en réaction ont été plongés dans un bain-marie dont la température était maintenue au dixième de degré.

(1) Pour la technique des dosages, voir ces *Annales*, **26**, p. 161, 1911.

L'ensemble des résultats obtenus, représentés graphiquement par la courbe qui est le plus à droite de la figure (décembre 1910), montre que l'hydrolyse du glucoside par l'amygdalinase présentait alors un maximum d'activité lorsqu'on ajoutait au mélange en réaction une petite quantité de soude, égale à 0 c. c. 6 de solution centinormale, c'est-à-dire double de celle qui était nécessaire pour obtenir la saturation en présence de la phtaléine du phénol.

La même courbe a été obtenue en dosant, non plus l'acide cyanhydrique mis en liberté, mais le pouvoir réducteur, c'est-à-dire en déterminant l'activité de l'amygdalase. Cette détermination a été faite sur une partie aliquote du liquide restant après la distillation de l'acide cyanhydrique, à l'aide de la méthode décrite autrefois par l'un de nous. Voici les chiffres obtenus :

TABLEAU II

QUANTITÉS D'ACIDE OU D'ALCALI ajoutées dans chaque expérience	POURCENTAGES D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉE					
	Exp. I	II	III	IV	V	VI
c.c. —	—	—	—	—	—	—
0,7 SO^4H^2 N/100.	29,4	»	»	»	»	»
0,6 — — (réaction neutre à l'hélianthine) . .	manque	»	»	»	»	»
0,5 — —	41,7	»	»	»	»	»
0,3 — —	50,5	»	»	»	»	»
0,1 — —	58,5	»	»	»	»	»
0,0 — — (réaction naturelle)	60,1	58,8	59,1	60,1	59,1	60,1
0,1 NaOH N/100.	65.6	»	»	»	»	»
0,2 — —	»	67,0	»	»	»	»
0,3 — — (réaction neutre à phtaléine). . . .	»	»	67,9	»	68,7	»
0,4 — —	»	71,9	»	»	»	»
0,6 — —	»	70,0	»	»	»	»
0,7 — —	»	»	»	70,0	»	»
0,8 — —	»	67,9	»	»	»	»
0,9 — —	»	»	»	68,7	68,7	»
1,0 — —	»	64,7	»	»	»	»
1,2 — —	»	»	»	64,7	»	»
1,3 — —	»	»	»	»	64,0	»
1,4 — —	»	»	»	58,8	»	»
1,5 — —	»	»	»	»	»	57,9
1,6 — —	»	»	53,1	»	56,8	»
1,7 — —	»	»	50,5	»	»	»
1,8 — —	»	»	47,2	»	»	»
3,0 — —	»	»	»	19,3	»	»
3,4 — —	»	»	»	»	»	6,6
3,6 — —	»	»	»	»	»	0,0

Or, en recommençant nos déterminations deux ans plus tard, en juillet 1912, avec la même préparation diastasique et dans des conditions absolument identiques aux précédentes, nous avons été surpris par la différence des résultats obtenus : les nouveaux donnaient bien encore une même courbe avec l'amygdalinase et l'amygdalase, mais cette courbe, au lieu d'être simplement décalée dans le sens de la hauteur et de présenter un sommet un peu plus bas que celui de la courbe de 1910, comme on pouvait s'y attendre, à cause de la faible perte d'activité due à l'influence du temps, était aussi décalée dans le sens latéral, son sommet se trouvant, cette fois, dans une région de plus grande richesse en ions hydrogène, correspondant même à une acidité très nette à la phtaléine du phénol.

Ces nouveaux résultats sont contenus dans les deux tableaux ci-dessous; la courbe qui les résume est la seconde de la figure, à partir du haut.

Tableau III

Quantités d'acide ou d'alcali ajoutées dans chaque expérience	Pourcentages d'amygdaline dédoublée d'après l'acide cyanhydrique			Pourcentages d'amygdaline dédoublée d'après le pouvoir réducteur	
	Exp. I	II	III	Exp. I	II
c.c. —	—	—	—	—	—
0,9 SO^4H^2 N/100	»	»	18,1	»	15,2
0,8 — —	»	24,7	»	»	»
0,6 — — (réaction neutre à l'hélianthine)	39,5	»	»	39,5	»
0,5 — —	»	»	43,6	»	44,7
0,4 — —	»	48,6	»	»	»
0,3 — —	»	»	53,5	»	»
0,15 — —	»	»	58,4	»	60,7
0,1 — —	65,8	»	»	»	»
0,05 — —	»	63,4	»	»	»
0,0 — — (réaction naturelle)	65,8	63,4	64,2	68,9	65,6
0,05 Na^2CO^3 N/100	65,8	»	»	66,3	»
0,1 — —	62,6	63,4	»	»	»
0,2 — —	64,2	»	»	66,0	»
0,3 — — (réaction neutre à la phtaléine)	»	»	62,6	»	64,7
0,4 — —	»	60,9	»	»	»
0,6 — —	60,1	»	»	60,7	»
0,9 — —	»	54,3	»	»	»
1,2 — —	46,1	»	»	»	»
1,3 — —	»	»	44,4	»	»
1,8 — —	»	40,3	»	»	»
2,3 — —	»	»	30,4	»	29,7

Avant d'admettre d'une manière définitive cette curieuse modification diastasique, nous avons tenu à reproduire nos expériences après une seconde attente de deux années. Les résultats obtenus, après cette nouvelle attente, montrent que le phénomène s'est encore un peu accentué. On en jugera par les dosages contenus dans le tableau IV et, plus facilement encore, par la courbe datée du mois de juillet 1914, qui les résume.

TABLEAU IV

QUANTITÉS D'ACIDE OU D'ALCALI ajoutées dans chaque expérience	POURCENTAGES D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉE D'APRÈS			
	L'ACIDE CYANHYDRIQUE			LE POUVOIR RÉDUCTEUR
c.c.	Exp. I	II	III	Exp. I
1,0 SO^4H^2 N/100	»	13,2	»	»
0,9 — —	18,9	»	»	«
0,7 — —	32,1	»	»	»
0,6 — — (réaction neutre à l'hélianthine) . .	»	»	37,0	38,8
0,5 — —	»	43,6	»	»
0,45 — —	»	»	46,1	47,3
0,3 — —	53,5	»	»	»
0,25 — —	»	»	54,3	56,9
0,1 — —	59,7	»	»	»
0,05 — —	»	»	60,1	61,8
0,0 — — (réaction naturelle)	60,1	59,3	60,1	63,7
0,15 NaOH N/100	»	»	58,4	61,8
0,2 — —	58,4	57,6	»	»
0,4 — —	56,0	»	»	»
0,6 — —	»	51,9	»	»
0,9 — —	42,8	»	»	»
1,0 — —	»	45,3	»	»
1,5 — —	»	37,9	»	»
1,6 — —	31,3	»	»	»

La guerre ayant empêché la publication de ces recherches, nous avons profité de la circonstance pour effectuer encore une série de mesures avant de les donner à l'impression. Cette série date de février 1920, c'est-à-dire qu'elle a porté sur une préparation diastasique ayant atteint une dizaine d'années. Nous avons mesuré seulement dans cette série la quantité d'acide cyanhydrique mise en liberté.

Les résultats, donnés dans le tableau V et représentés par la courbe la plus basse de la figure, montrent que l'activité de la diastase a encore un peu diminué, mais que la réaction optimale ne s'est plus modifiée d'une manière appréciable depuis 1914. C'est une constatation à laquelle on pouvait

presque s'attendre, étant donnée la faible différence observée entre les deux précédentes concentrations optimales.

TABLEAU V

QUANTITÉS D'ACIDE OU D'ALCALI ajoutées dans chaque expérience	POURCENTAGES D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉE d'après l'acide cyanhydrique
—	—
0,8 SO^4H^2 M/200	21,3
0,5 — —	35,3
0,2 — —	45,2
0,0 — — (réaction naturelle)	50,1
0,2 NaOH M/100	49,3
0,5 — —	46,8
1,5 — —	27,9
2,5 — —	0

Ajoutons, en terminant, que notre préparation diastasique a été conservée toute la durée de ces recherches dans un flacon bien bouché et à l'abri complet de la lumière et qu'elle fournit encore, en solution aqueuse, pratiquement la même réaction qu'au début; nous avons, en effet, trouvé en février 1920 : $10^{-6,5}$ au lieu de $10^{-6,3}$ en décembre 1910.

En résumé, nous pouvons dire que, sous l'influence du temps, non seulement l'amygdalinase et l'amygdalase retirées des amandes perdent leur activité avec une grande lenteur (environ 1/3 en dix ans), mais qu'elles exigent une concentration optimale en ions hydrogène de plus en plus grande. Cette concentration varie de telle sorte que la réaction la plus favorable à l'action diastasique passe peu à peu, lorsqu'on la détermine avec la phtaléine du phénol, de l'alcalinité à l'acidité. La variation de concentration optimale en ions hydrogène n'est pas proportionnelle au temps : assez rapide au début, elle se ralentit dans la suite et cesse pratiquement après quelques années.

Dans la théorie émise par l'un de nous, concernant la nature et le mode d'action des diastases, le curieux phénomène de vieillissement que nous signalons peut s'expliquer, soit par une plus grande résistance de la complémentaire activante à l'action destructrice des ions hydrogènes, soit par une plus faible activation de ces derniers vis-à-vis du glucoside, soit même par les deux modifications à la fois. Il est assez probable que la variation de la concentration optimale en ions hydrogène avec l'âge n'est pas un phénomène particulier aux deux diastases que nous venons d'étudier et peut-être intervient-il dans le mécanisme encore si obscur de la maturation des graines.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ DE LA SALICINASE

par MM. Gabriel BERTRAND et Arthur COMPTON.

On sait que l'activité d'une diastase, mesurée par le poids de substance détruite dans un temps donné, augmente d'abord rapidement avec la température, passe par un maximum, puis décroît jusqu'à devenir nulle. On appelle *température optima* (ou optimale) la température à laquelle correspond la plus grande activité de la diastase et *température mortelle*, celle à laquelle, au contraire, disparaît toute activité (1). Communément, on admet que chaque diastase possède une température optimale et une température mortelle propres et l'on va quelquefois jusqu'à comparer ces températures à de véritables constantes physiques, analogues aux points de fusion et d'ébullition de certaines substances définies.

Il est évident que les diastases n'ont pas toutes la même température optima, ni la même température mortelle, mais les différences, parfois très accusées, tiennent bien plus, comme il ressort des recherches modernes, à l'origine des diastases considérées qu'à ce que l'on pourrait appeler leur espèce, d'après la nature de leur action chimique. C'est ainsi qu'une même espèce d'oxydase, la tyrosinase, peut être rapidement détruite vers 60° ou 70° ou résister jusqu'à la température de l'eau bouillante, suivant qu'elle provient de certains champignons ou des téguments du blé (2).

Nous avons démontré, en opérant sur l'amygdalase et sur l'amygdalinase, que la température optima, loin d'être constante et, par suite, facile à retrouver quelles que soient les conditions expérimentales, varie au contraire dans une large

(1) Pas toujours d'une manière définitive, Voir G. Bertrand et M. Rosenblatt. *Bull. Soc. Chim.*, 1914, 4e série, **15**, p. 674 et 762.

(2) G. Bertrand, *Bull. Soc. Chim.*, 1896, 3e série, **15**, p. 1216. — G. Bertrand et W. Muttermilch; *Ibidem*. Ces *Annales*, 1907, **21**, p. 833. — G. Bertrand et Rosenblatt; *Ibidem*, 1910, **24**, p. 653.

mesure, suivant la durée de l'action : elles est d'autant plus haute, toutes choses égales d'ailleurs, que le temps accordé à la diastase pour agir sur la substance passive est plus court (1).

Étant donnée l'importance de cette observation au point de vue des recherches sur les diastases en général, nous avons étendu nos expériences à la salicinase que nous avions découverte, à côté de l'amygdalase et de l'amygdalinase, dans les amandes (2). Mais au lieu de déterminer, comme précédemment, les températures optima correspondant seulement à deux durées d'action différentes (deux heures et quinze heures), nous avons multiplié les séries d'expériences et les avons échelonnées depuis la durée d'action d'une heure jusqu'à celle de quatre jours. Nous avons recherché en même temps les températures mortelles.

Pour avoir de bonnes mesures dans un tel genre d'expériences, il faut que les proportions de glucoside hydrolysé soient assez grandes, mais il ne faut pas qu'elles soient trop rapprochées de l'hydrolyse totale. En conséquence, nous avons choisi des concentrations diastasiques permettant d'hydrolyser de la moitié aux deux tiers environ de la salicine présente. Naturellement, ces concentrations ont été d'autant plus faibles que les durées d'action ont été plus longues. Quant aux concentrations du glucoside, elles ont été d'une molécule-gramme pour 15 litres dans presque toutes les expériences et d'une molécule-gramme pour 27 litres 1/2 dans les expériences de deux heures et de quinze heures. Ces variations ne devaient pas avoir d'influence sur la marche du phénomène envisagé, car il avait été établi par des recherches préliminaires de l'un de nous que ni la concentration de la diastase, ni la concentration de la substance passive, ne modifient la température optima (3).

Les tubes dans lesquels avait lieu l'action diastasique étaient des tubes en verre d'Iéna, très résistants à la dissolution, de manière à n'avoir pas à craindre de changements de vitesse de la réaction par suite du passage dans le milieu des matériaux solubles du verre. L'eau employée était de l'eau très pure,

(1) Ces *Annales,* 1912, **26**, p. 161.
(2) *C. R.*, 1913, **157**, p. 797.
(3) A. Compton. Ces *Annales*, 1914, **28**, p. 867; *Ibidem.*, 1916, **30**, p. 497.

obtenue par distillation dans le vide avec un appareil en verre.

Pour éviter l'ingérence des microbes, nous avons pris soin de n'opérer que dans un matériel très propre, passé à la vapeur et séché avant l'usage. Il n'a pas été nécessaire de prendre d'autre précaution, à cause du pouvoir suffisamment antiseptique de la saligénine qui prend naissance aux dépens du glucoside, par suite de l'hydrolyse diastasique.

La diastase a toujours été dissoute, en quantité un peu supérieure à celle qui était nécessaire pour les expériences d'une série à la même température, une demi-heure avant d'être répartie, par portions aliquotes, dans les tubes contenant déjà la dissolution du glucoside portée à la température choisie.

Les tubes ont été maintenus à température constante à l'aide d'un jeu de grands bains-marie réglables et l'on a mesuré les proportions de salicine dédoublée d'après le pouvoir réducteur du glucose.

Nous donnons pour chaque série d'expériences les pourcentages de glucoside hydrolysé aux diverses températures (1) et la courbe correspondante. C'est par la construction de cette courbe que nous avons obtenu la température optima et la température mortelle de la série (2).

Série 1.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	12 —
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	1 heure.

T	Hydrolyse
42°	42,0 p. 100
47°2	46,3 —
51°5—51°2	48,7 —
54°2	49,0 —
57°2	49,5 —
60°6—60°8	45,0 —
64°	38,5 —

Série 2.

Salicine. . . .	209 milligr.
Diastase . . .	8 —
Eau.	20 c. c.
Durée d'action.	2 heures.

T	Hydrolyse
23° —22°7	28,7 p. 100
30°4	40,3 —
36°8—36°7	50,2 —
42°2	57,1 —
45°9—45°8	57,4 —
50°3	59,9 —
54°6	59,9 —
56°8	57,9 —
62°2—62°4	43,5 —

(1) Lorsque nous avons constaté une variation de température du bain-marie durant une expérience, nous donnons les deux extrêmes.

(2) Les figures données ici sont des réductions au cinquième environ des courbes dessinées sur du papier quadrillé. Les températures optima déterminées par les sommets des courbes doivent être exactes, pour la plupart, à moins d'un degré près. L'approximation est sans doute moitié moindre pour les températures mortelles.

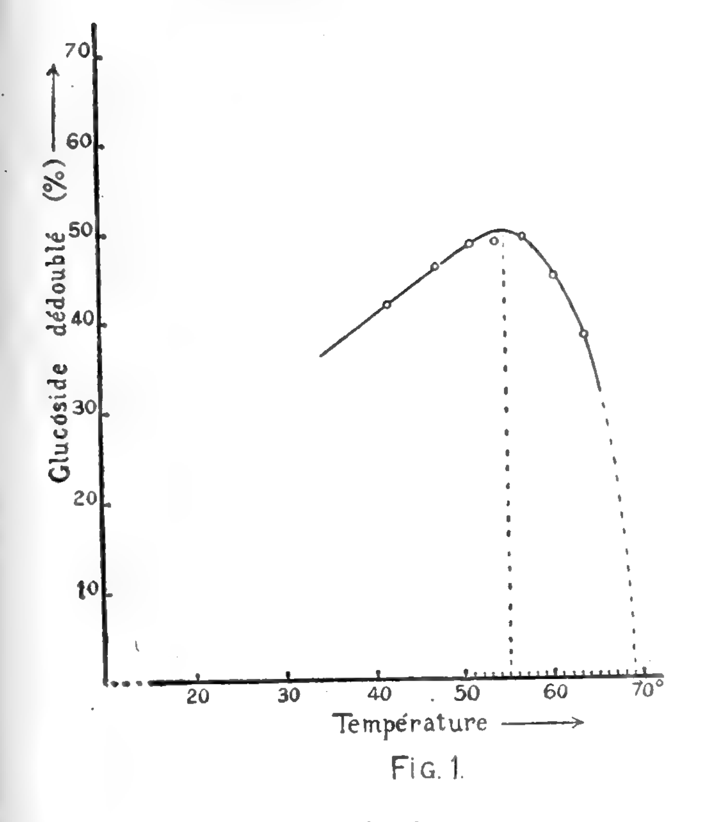


FIG. 1.

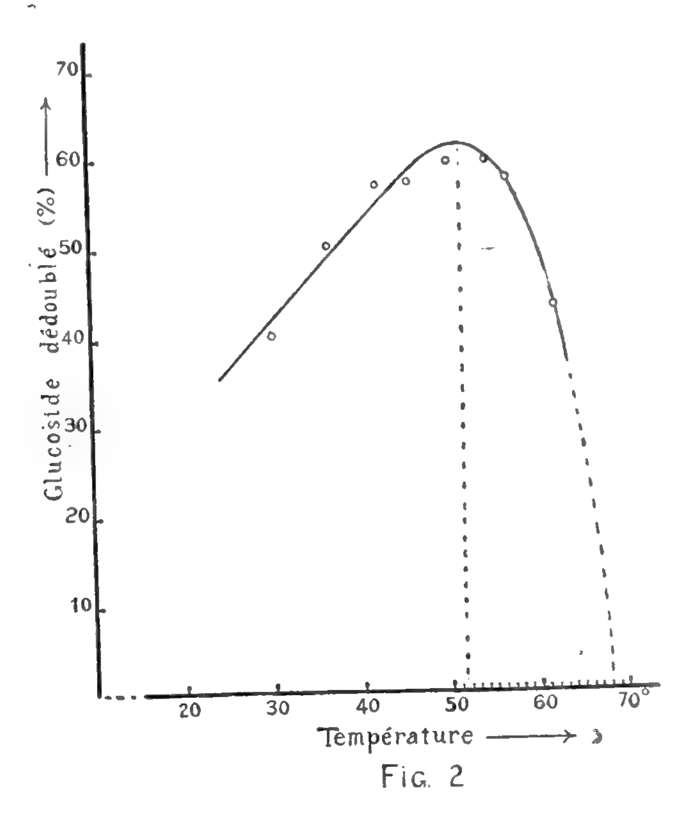


FIG. 2

Série 3.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	2 mg. 2
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	8 heures.

T	Hydrolyse
16°6	21,3 p. 100
21°5	26,0 —
30°2	37,7 —
36°2—36°3	44,2 —
42°4	45,5 —
46°5	44,7 —
51°0—51°2	42,5 —
57°3	30,7 —
60°5—60°4	21,3 —

Série 4.

Salicine. . . .	209 milligr.
Diastase . . .	1 mg. 3
Eau.	20 c. c.
Durée d'action.	15 heures.

T	Hydrolyse
17°,0	24,0 p. 100
23°0—21°5	35,1 —
29°8—30°2	42,2 —
36°4	47,6 —
42°3—42°5	48,3 —
47°2—47°0	43,2 —
50°6—50°9	36,8 —
57°2	18,7 —
60°8—61°0	10,9 —

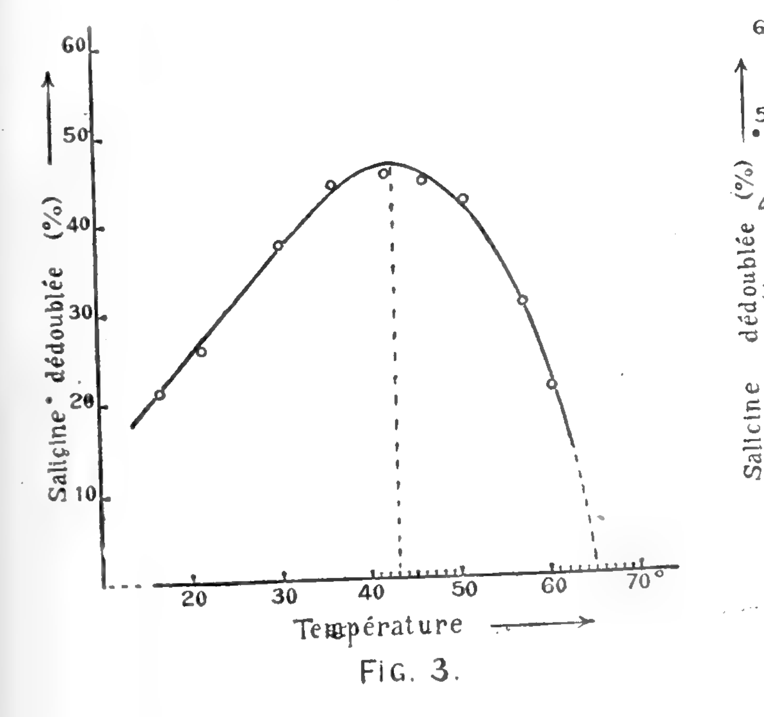


FIG. 3.

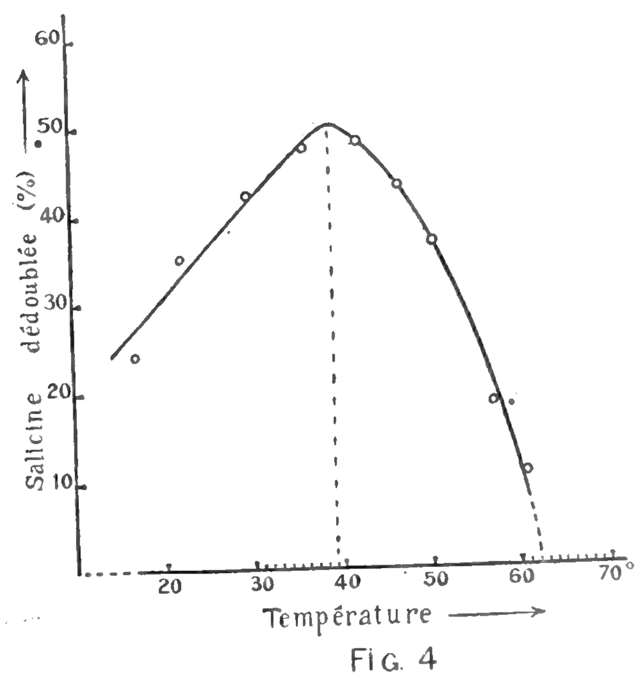


FIG. 4

Série 5.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	1 mg. 5
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	20 heures.

T	Hydrolyse
17°8—17°3	30,7 p. 100
22°7—22°4	39,0 —
30°6	49,0 —
36°9—37°0	51,7 —
42°4	49,5 —
45°8—45°6	43,3 —
51°6—51°4	29,8 —
54°8—54°5	22°7 —

Série 6.

Salicine. . . .	286 milligr
Diastase . . .	1 —
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	22 heures.

T	Hydrolyse
16°8—17°0	21,0 p. 100
21°5	30,3 —
30°4—30°8	37,7 —
37°0	36,3 —
42°4—42°5	31,2 —
45°6—45°7	26,3 —
51°2—51°4	16,3 —
54°5—54°6	12,7 —

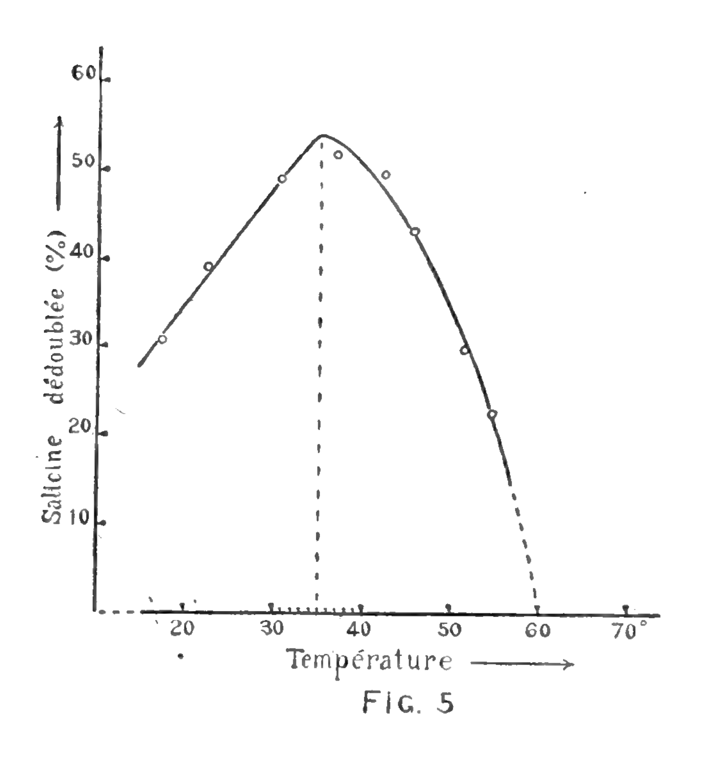


FIG. 5

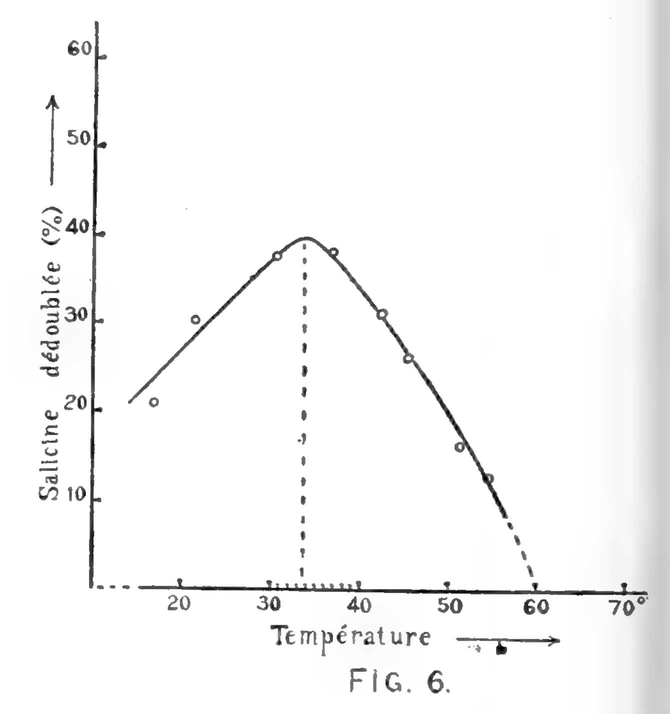


FIG. 6.

Série 7.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	1 mg. 5
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	27 heures.

T	Hydrolyse
15°2—15°0	36,3 p. 100
17°4—18°7	39,7 —
22°4—23°0	48,2 —
30°6—31°0	57,7 —
36°9—36°8	61,2 —
42°4—42°2	55,8 —
45°6	51,3 —
51°6—51°5	34,2 —
54°5—54°3	26,8 —

Série 8.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	1 —
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	32 heures.

T	Hydrolyse
15°1	26,3 p. 100
18°6—19°1	31,5 —
23°2—23°3	37,7 —
37°0—36°9	38,5 —
42°4	34,5 —
51°7—51°5	17,5 —
54°6—54°5	15,2 —

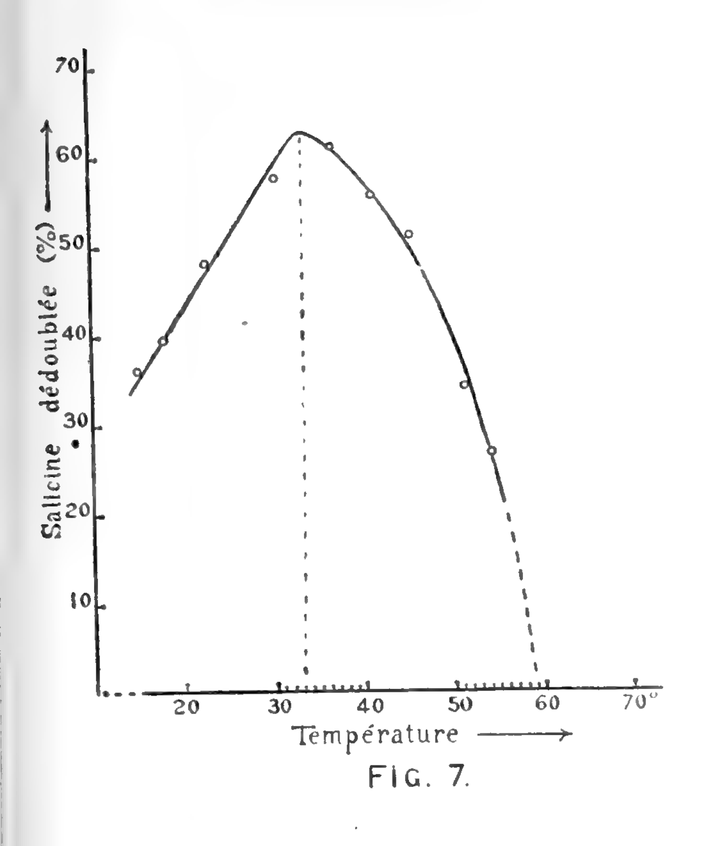


FIG. 7.

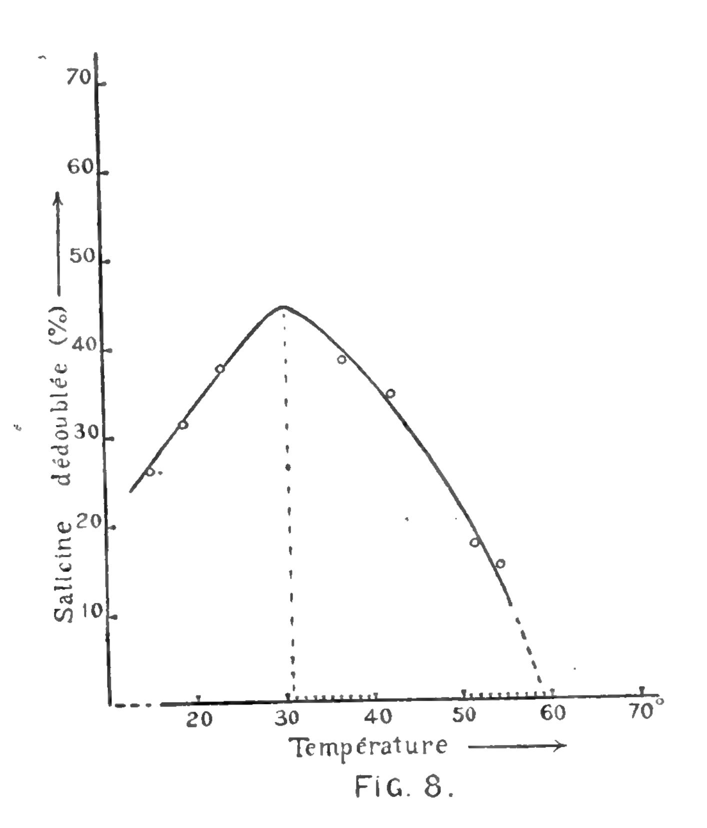


FIG. 8.

Série 9.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	1 —
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	45 heures.

T	Hydrolyse
15°0—15°1	35,5 p. 100
19°4—19°3	43,0 —
23°5	48,2 —
31°0—30°6	52,2 —
37°0	48,7 —
42°2	37,2 —
51°5	18,3 —

Série 10.

Salicine. . . .	286 milligr.
Diastase . . .	1 —
Eau.	15 c. c.
Durée d'action.	64 heures.

T	Hydrolyse
15°	44,7 p. 100
18°8—16°4	45,5 —
23°0—22°5	49,0 —
30°5—30°7	51,6 —
37°0	43,7 —
42°4—42°5	33,2 —
46°3—46°6	23,8 —
52°0—51°8	13,2 —

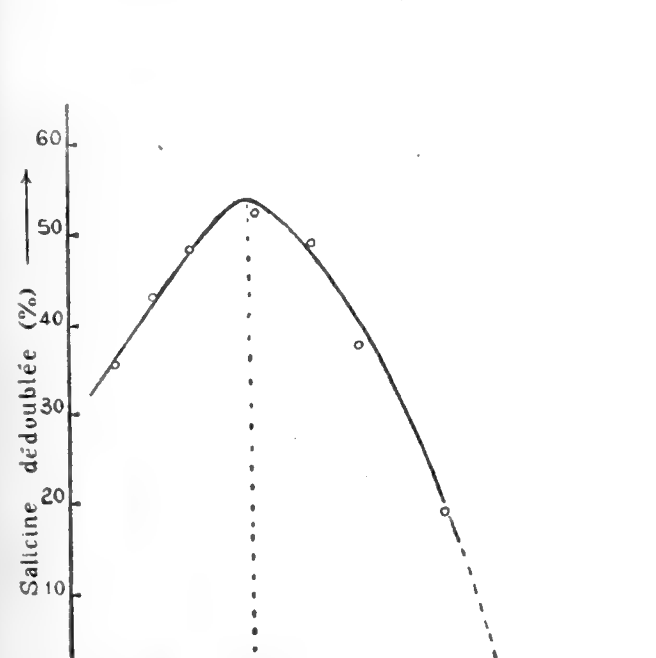


FIG. 9

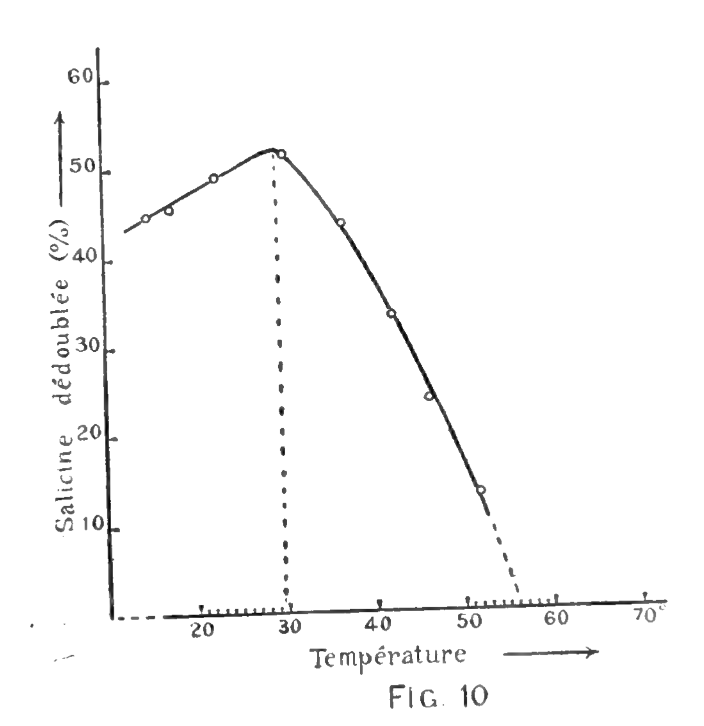


FIG. 10

Série 11.

Salicine	286 milligr.
Diastase.	1 —
Eau	15 c. c.
Durée d'action	96 heures.

T	Hydrolyse
15°0	60,8 p. 100
18°0—17°7	68,5 —
23°0—22°6	70,3 —
30°5—30°6	72,7 —
37°0	70,8 —
42°4	52,7 —
46°3—46°9	33,2 —
52°0	22,2 —

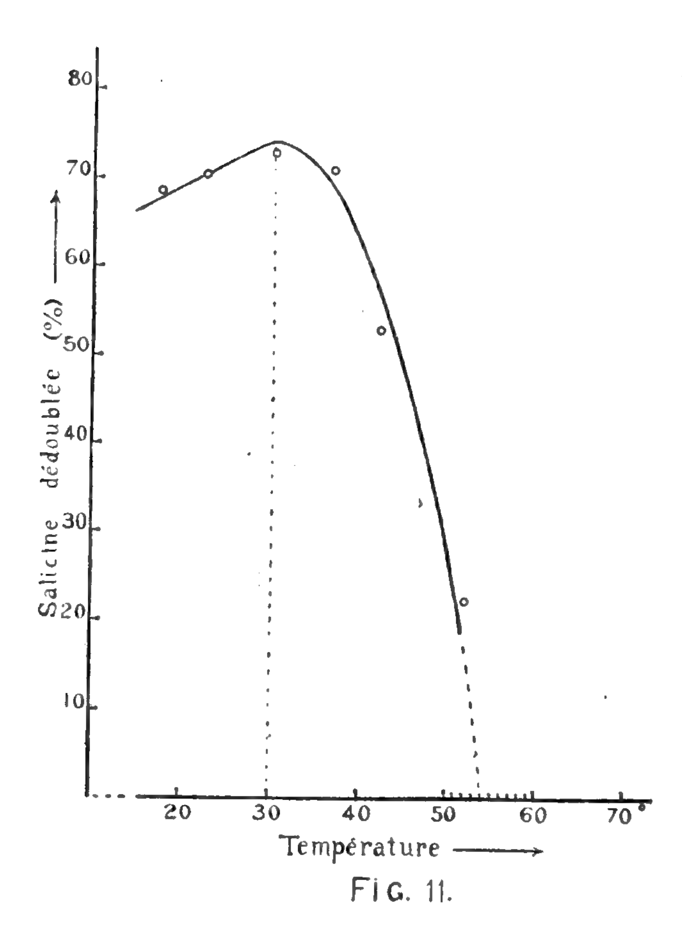


FIG. 11.

Les résultats principaux de toutes ces déterminations sont réunis dans le tableau suivant :

Durée des expériences	TEMPÉRATURES optima	TEMPÉRATURES mortelles
1 heure	+55°	+69°
2 heures	+51°5	+68°
8 —	+43°	+65°
15 —	+39°	+62°
20 —	+35°	+60°

Durée des expériences		Températures optima	Températures mortelles
—		—	—
22 —	. . . .	+33°5	+60°
27 —	. . . .	+33°	+59°
32 —	. . . .	+30°5	+59°
45 —	. . . .	+30°	+57°
64 —	. . . .	+29°5	+56°
69 —	. . . .	+30°	+54°

Ces résultats montrent qu'au point de vue de la température optima la salicinase se comporte comme l'amygdalase et l'amyg-

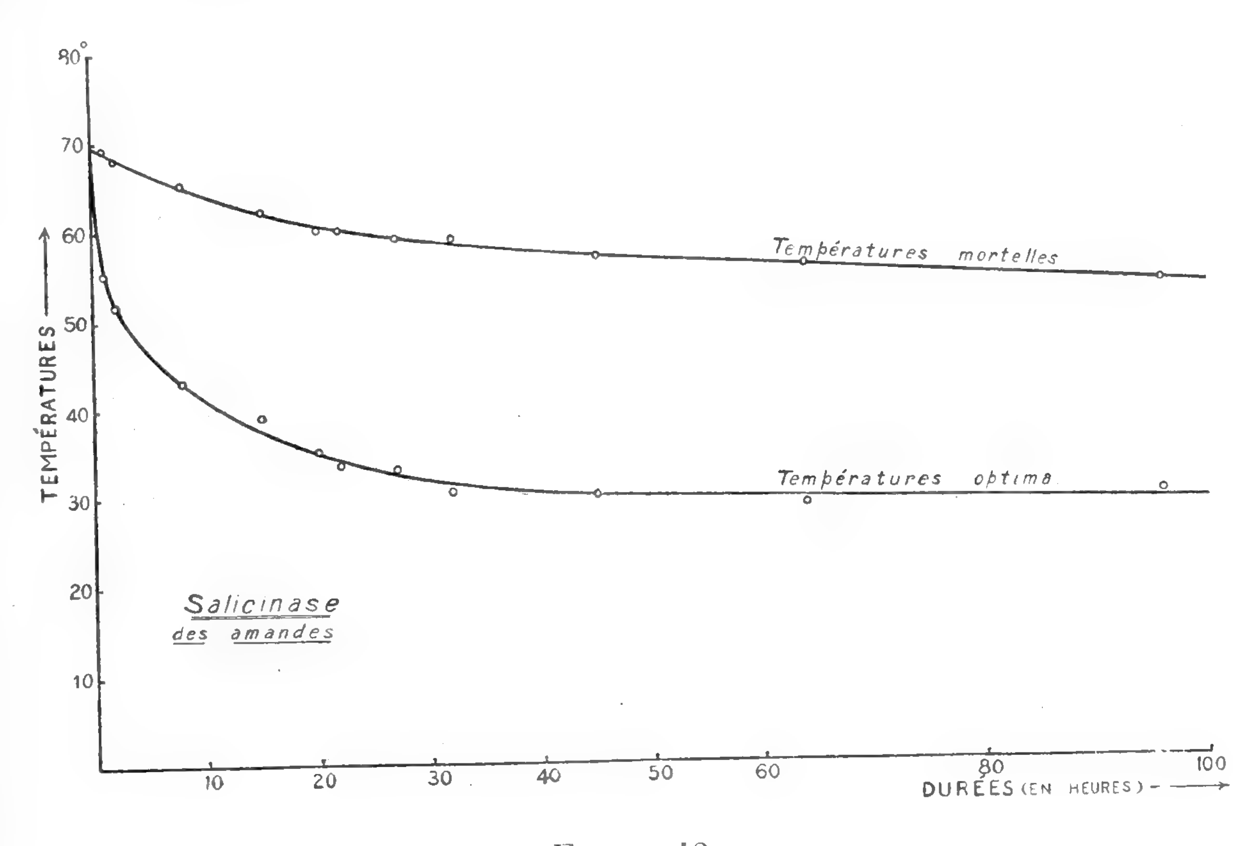


Figure 12.

dalinase. Ils montrent, en outre, ce qui n'était pas encore apparu d'une manière aussi nette, que la température mortelle varie, comme la température optima, en sens inverse de la durée des expériences, ou, ce qui revient au même, du temps pendant lequel la diastase est soumise à l'action destructrice de la chaleur.

Mais ce n'est pas tout. En portant en abscisses les durées d'expériences et en ordonnées les températures optima et les températures mortelles, on obtient une figure formée de deux courbes continues très suggestives (fig. 12). On voit, en effet, par cette figure (courbe des températures optima), qu'au-dessous d'une certaine température, voisine ici de + 30°, la tem-

pérature optima cesse pour ainsi dire de diminuer quand on prolonge la durée d'action de la diastase. A partir et au-dessous de cette température, la diastase ne subit donc pour ainsi dire plus de décomposition sous l'influence de la chaleur : elle est dans une zone de thermostabilité qui correspond, d'ailleurs, aux conditions de son apparition et de son fonctionnement dans le végétal.

Nous avons réalisé une expérience dont les résultats donnent une bonne mesure de la résistance de la salicinase maintenue en solution aqueuse dans la zone de thermostabilité.

Un premier matras contenant :

Poudre diastasique	42 milligr.
Eau	200 c. c.
Toluène.	XX gouttes.

a été placé pendant 23 jours dans un bain-marie à la température de + 27°. Un second matras, en tout semblable, a été mis, parallèlement, dans un bain-marie à + 36°. Et l'on a déterminé de temps à autre l'activité de la diastase chauffée en prélevant 15 cent. cubes de liquide, y ajoutant 286 milligr. de salicine, laissant agir durant 24 heures à la température de + 30°, et dosant le pouvoir réducteur. On a trouvé :

DURÉES DE SÉJOUR au bain-marie	SALICINE HYDROLYSÉE PAR LA DIASTASE	
	chauffée à + 27°	chauffée à + 36°
1 jour	76,0 p. 100	76,0 p. 100
2 jours.	76,0 —	65,7 —
3 —	76,0 —	58,5 —
5 —	»	55,8 —
11 —	»	30,3 —
13 —	71,7 —	» —
21 —	» —	0,4 —
23 —	66,7 —	» —

C'est-à-dire que, en solution purement aqueuse et en présence de toluène, — conditions un peu différentes de celles dans lesquelles nous avons déterminé les courbes et peut-être moins favorables à la conservation de la diastase que la solution de glucoside — la salicinase a été presque complètement détruite en trois semaines à la température de + 36°, tandis qu'elle a

conservé environ les 9/10 de son activité après la même période de chauffage à la température de +27°.

Dans les laboratoires, il est beaucoup plus difficile de réaliser le maintien aux températures comprises entre zéro et +30° qu'aux températures notablement supérieures à la température ordinaire. D'autre part, les actions diastasiques sont parfois assez lentes quand on ne les aide pas en chauffant un peu. Aussi expérimente-t-on le plus souvent sur les diastases à des températures plutôt élevées. Le phénomène catalytique se complique alors d'une destruction plus ou moins importante du réactif biologique. Il faudra évidemment tenir compte des faits que nos recherches viennent de mettre en évidence lorsqu'on voudra étudier le rôle physiologique ou les lois d'action d'une diastase.

On voit encore, en examinant la figure 12, que lorsqu'on place le réactif diastasique dans des conditions de température de plus en plus élevée, on exalte continuellement sa vitesse d'action, phénomène conforme, dans son allure, à la loi générale d'action de la chaleur sur les réactions chimiques.

Il résulte, en conséquence de toutes ces observations, que la notion de température optima, telle qu'on la conçoit ordinairement, disparaît. Il en est de même de la notion de température mortelle. Certes, on continuera toujours à se servir des températures optima et des températures mortelles, notamment pour différencier ou séparer des diastases contenues dans un mélange, mais on n'accordera plus aux résultats obtenus qu'une valeur absolument contingente et l'on devra donner, dans les comptes rendus des expériences, des détails circonstanciés sur le mode opératoire.

Il apparaît, d'autre part, comme étant particulièrement importante, ce que l'on pourrait appeler la *température maxima d'activité*, température la plus haute à laquelle la diastase puisse encore opérer comme catalyseur. Cette température, voisine de +70° dans le cas de la salicinase des amandes, est en même temps la plus élevée que puisse atteindre passagèrement le ferment soluble. Ainsi, la température maxima d'activité est aussi celle de destruction instantanée de la diastase par la chaleur.

Il n'est pas sans intérêt de remarquer, en terminant, que la

température limite à laquelle la diastase agit le plus rapidement sur la substance passive n'est pas du tout celle qui correspond au rendement le plus élevé. Le poids de glucoside dédoublé dans l'unité de temps, supposée très petite, est bien aussi grand que possible, mais la diastase est détruite sans avoir pu intervenir dans une quantité de travail chimique aussi considérable qu'à une température plus basse, comprise, notamment, dans la zone de thermostabilité. Cette différence entre la vitesse d'action et le rendement économique de la diastase ressort très nettement des séries d'expériences que nous avons publiées dans ce mémoire.

SUR UN LIQUIDE OU SE MAINTIENT INVARIABLE LE NOMBRE DE BACTÉRIES DES CULTURES

par René LEGROUX et Georges ELIAVA.

Pour étudier l'action de substances diverses sur les bactéries vivantes, il est nécessaire de placer celles-ci dans des liquides qui ne les altèrent pas et ne favorisent pas leur développement. L'eau distillée détruit rapidement la plupart des microbes ; et même l'eau dite physiologique, à 9 grammes de NaCl pour 1.000, considérée comme isotonique avec les corps microbiens, ne laisse pas de les altérer, surtout à la température de l'étuve.

Nous avons cherché, au cours d'expériences qui nécessitaient le séjour de microbes vivants à 37° pendant seize heures, quel était le liquide capable de les conserver dans leur état primitif. Nos essais ont porté sur trois microbes différents : *staphylococcus aureus*, *vibrio choleræ*, *bacillus anthracoïdes*.

A de l'eau distillée neutre au rouge de méthyle, salée à 9 grammes pour 1.000, puis stérilisée, nous ajoutons soit du bouillon nutritif, soit du sérum liquide, soit de l'extrait globulaire (1), par fraction de 1/10 de centimètre cube pour 100 cent. cubes.

Dans ces dilutions, nous émulsionnons avec soin les bactéries provenant d'une culture sur gélose âgée de seize heures, en proportion telle que la numération des colonies soit facile dans les conditions suivantes : I goutte, 1/10, 1/100 de goutte de cette émulsion sont ajoutés à des tubes de gélose fondue, et la gélose est coulée aussitôt en boîtes triangulaires (2) qui sont rapidement refroidies et portées à l'étuve à 37° ; nous plaçons à côté de ces boîtes, pour un même temps, l'émulsion qui a servi à les ensemencer. Après seize heures, nous prélevons I goutte, 1/10, 1/100 de goutte de cette émulsion pour ensemencer une

(1) *C. R. Acad. Sciences*, **166**, p. 597, 1918 ; **170**, p. 901, 1920.
(2) Ces *Annales*, 1921, p. 231.

TABLEAU I. — **Eau physiologique + Sérum.**

STAPHYLOCOQUE

SÉRUM c. c.	ENSEMENCEMENT immédiat 1 goutte	ENSEMENCEMENT immédiat 1/10 de g.	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1 goutte	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1/10 de g.	RÉSULTATS	AGGLUTINATION
0,2	676	59	0	0	Destruction.	
0,3	743	64	25	0		0
0,4	611	54	111	0		0
0,5	704	59	204	10		0
0,6	624	57	325	21	Vers l'équilibre.	Très fine.
0,7	623	51	515	47		Forte.
0,8	621	73	510	34	Destruction apparente.	Forte.
0,9	675	49	450	12		Très forte.
1,0	731	41	442	8		Forte.
1,1	601	55	690	43	Accroissement.	Traces.
1,2	698	76	925	89		0
1,3	744	52	Innombrables.		»	0

TABLEAU II. — **Eau physiologique + Sérum.**

VIBRION CHOLÉRIQUE

SÉRUM c. c.	ENSEMENCEMENT immédiat 1 goutte	ENSEMENCEMENT immédiat 1/10 de g.	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1 goutte	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1/10 de g.	RÉSULTATS	AGGLUTINATION
0,4	528	53	0	0	Destruction.	0
0,5	515	62	22	2		0
0,6	580	68	115	24	Vers l'équilibre.	Traces.
0,7	421	39	396	41		Traces.
0,8	499	45	475	43	Destruction apparente.	Très fine.
0,9	413	20	328	14		Forte.
1,0	526	38	301	17		Forte.
1,1	513	68	379	19		Fine.
1,2	462	72	Innombrables.			0
1,3	469	41	Innombrables.		Accroissement.	0

deuxième série de boîtes triangulaires qui sont mises seize heures à 37°. La numération des colonies se fait dans chaque cas au

sortir de l'étuve. La comparaison des nombres des deux séries nous indique si le liquide a détruit les microbes, ou s'il a favorisé leur développement.

Les essais entrepris avec le *bouillon nutritif* ont été si inconstants que nous n'avons pas poursuivi les expériences avec ce milieu.

Nous avons utilisé le *sérum liquide* qui a une moindre valeur nutritive que le bouillon, mais qui favorise aussi la culture à une certaine dilution. Les résultats que nous avons obtenus ont été constants, que ce sérum fût fraîchement recueilli ou qu'il fût vieux de plusieurs mois, qu'il ait été chauffé ou non à 56°.

Nous avons noté (tableau I et II) que les microbes dilués dans l'eau physiologique additionnée de 0 c. c. 6 jusqu'à 1 c. c. 1 de

TABLEAU III. — **Eau physiologique + Sérum.**

B. ANTHRACOÏDES

SÉRUM c. c.	ENSEMENCEMENT immédiat 1 goutte	ENSEMENCEMENT immédiat 1/10 de g.	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1 goutte	ENSEMENCEMENT après 16 h. à 37° 1/10 de g.	RÉSULTATS	AGGLUTINATION
0,1	612	75	0	0	Destruction.	0
0,2	695	70	0	0		0
0,3	515	39	10	0		0
0,4	640	45	50	9		0
0,5	501	41	75	15		0
0,6	424	29	395	31	Vers l'équilibre.	0
0,7	521	58	701	60		0
0,8	610	64	Innombrables.	265	Accroissement.	0

sérum pour 100 cent. cubes, sont agglutinés plus ou moins complètement après seize heures d'étuve. Cette agglutination devenait une cause d'erreur pour la numération des microbes puisque chaque amas se comporte comme un microbe isolé et ne donne, en gélose, qu'une seule colonie. Il était donc difficile de conclure pour *staphylococcus aureus* et *vibrio choleræ*, quelle était la dose de sérum qui laissât intacts ces deux germes.

Au contraire, *bacillus anthracoïdes* n'étant pas agglutiné s'est prêté à des numérations plus exactes : nous voyons (tableau III)

que l'addition à l'eau physiologique de doses variant de 0 c. c. 6 à 0 c. c. 7 de sérum ne modifie pas le nombre des bactéries. Cette même dose est, vraisemblablement, celle qui convient aux deux premiers microbes, mais on ne peut s'en rendre compte par la numération des colonies puisque, comme nous le voyons (tableau I et II), c'est exactement à la dose de 0 c. c. 6 que l'agglutination commence à paraître (1).

Pour remplacer le sérum, nous avons essayé les dilutions d'*extrait globulaire* : macération pendant quinze minutes à

TABLEAU IV. — **Eau physiologique + Extrait globulaire.**

STAPHYLOCOQUE					V. CHOLÉRIQUE					
	ENSEMENCEMENT					ENSEMENCEMENT				
E. G.	immédiat		après 16 h. à 37°		E. G.	immédiat		après 16 h. à 37°		RÉSULTATS
c. c.	1/10 de g.	1/100 de g.	1/10 de g.	1/100 de g.		1/10 de g.	1/100 de g.	1/10 de g.	1/100 de g.	
1,5	834	115	98	5	1,5	745	101	25	0	Destruction.
1,6	513	45	211	13	1,6	+ de 1.500	300	155	3	
1,7	485	33	306	21	1,7	525	12	200	0	
1,8	764	102	537	69	1,8	478	18	300	4	
1,9	385	19	361	8	1,9	729	104	725	125	Equilibre.
2,0	615	91	675	122	2,0	687	75	840	97	
2,1	713	104	849	161	2,1	615	101	Innombrables.	415	Accroissement.

80° de globules rouges de cheval ; cette préparation est à elle seule un aliment insuffisant pour beaucoup de bactéries, cependant, ajoutée aux milieux ordinaires, elle en augmente notablement la valeur nutritive.

D'après nos essais (tableau IV) une dose variant entre 1 c. c. 9 et 2 cent. cubes d'extrait globulaire pour 100 conserve les microbes sans altération ni développement pendant seize heures à 37°.

Nous voyons donc qu'il importe de choisir avec soin le liquide

(1) Cette agglutination qui se remarque avec certaines doses de sérum, sans qu'une dose inférieure la produise, est un phénomène qu'il faut peut-être rapprocher de certaines agglutinations dites « paradoxales » et qu'on cite comme spécifiques, qui ne seraient alors qu'une réaction commune.

où des bactéries vivantes doivent être mises en suspension, et que les substances ajoutées à l'eau physiologique : bouillon, sérum extrait globulaire agissent dans des limites très étroites; un écart de moins de 1/10 de centimètre cube d'une de ces substances dans 100 cent. cubes détruit une partie des microbes ou favorise leur culture, dans les conditions de notre expérience.

VACCINE ET CLAVELÉE

par

J. BRIDRÉ
Chef de laboratoire
à l'Institut Pasteur de Paris.

et

A. DONATIEN
Chef de laboratoire
à l'Institut Pasteur d'Algérie.

Tout récemment, Edm. Chaumier, se livrant à une « Enquête au sujet de la parenté de la clavelée avec la vaccine », rappelle ses travaux personnels et les expériences plus anciennes de Marchelli et de Sacco. Analysant un article de G. Martin et M. Léger sur la « Vaccination aux colonies », ce savant exprime ainsi son opinion : « La variole, la clavelée et la vaccine ne sont qu'une seule et même maladie. Il n'y a pas à faire intervenir là un virus fort et un virus faible. Il s'agit d'une maladie unique adaptée à des espèces différentes et réagissant un peu différemment suivant les espèces animales. Prenez de la variole, vous pouvez en faire du vaccin, vous pourriez en faire de la clavelée; prenez du vaccin, vous pourriez en faire de la clavelée ou de la variole. Prenez de la clavelée, vous en faites facilement du vaccin, vous pourriez en faire de la variole. »

Nous ne rappellerons pas les intéressantes discussions provoquées par la question de parenté entre la vaccine et la variole. Aux résultats impressionnants rapportés par les « unicistes » (Chaumier, Gauducheau, Voigt, etc.), des auteurs tels que Chauveau, Kelsh, Teissier, Camus, Duvoir, Mercier, Würtz, Bonnet et Huon, etc., ont opposé des expériences qui tendent à établir la « dualité » des virus.

Nous nous contenterons de passer une revue rapide des travaux qui se rattachent à la parenté de la vaccine et de la clavelée, seule question que nous nous soyons proposé d'étudier.

Marchelli, en 1802, inocule des enfants avec du virus claveleux dans le but de les préserver de la variole.

En 1809, Sacco répète, avec succès, les expériences de Marchelli. D'autre part, il inocule la vaccine à des moutons et

remarque que ceux-ci résistent ensuite à la contagion claveleuse. La « variole ovine » transportée sur l'homme ou sur la vache perd sa virulence pour le mouton et reste limitée, chez cet animal, au point inoculé.

Des essais avaient été faits, en 1806, dans le même ordre d'idées, par la « Société centrale établie pour l'extinction de la petite vérole en France par la propagation de la vaccine ». Les expériences ayant pour but de voir si la vaccine préservait le mouton de la clavelée aboutirent à des résultats contradictoires, et la Commission chargée de résoudre cette question n'osa se prononcer. On avait constaté, dans les expériences favorables, que des moutons, inoculés préalablement de vaccine, ne prenaient pas la clavelée par cohabitation avec des animaux claveleux, ou bien que les moutons « vaccinés » répondaient à la clavelisation par une lésion purement locale. Dans les expériences défavorables, des moutons vaccinés avaient contracté la clavelée par inoculation ou par simple cohabitation (Expériences de la Société d'Agriculture de Versailles).

Borrel a inoculé du vaccin jennérien à des moutons clavelisés et du claveau à des moutons vaccinés. La clavelée s'est développée chez les vaccinés et la vaccine chez les clavelisés.

Edm. Chaumier, en 1905, rapporte qu'il a inoculé la clavelée à une vache, à une chèvre et à un âne par scarifications cutanées étendues. Sur la vache, pas de résultat. Sur les deux autres animaux, petites tumeurs et lésions superficielles semblables à celles de la vaccine. L'inoculation, à la première vache, de tissu prélevé par raclage des lésions des autres animaux donne des pustules en nappe « ayant absolument l'aspect de la vaccine ». « Le produit se montra moins virulent pour l'enfant, mais donna néanmoins naissance à des pustules absolument semblables au vaccin le plus normal et qui évoluèrent de la même façon. Une soixantaine d'enfants, vaccinés ou revaccinés avec le virus d'origine claveleuse, furent réinoculés avec du vaccin de génisse très virulent et chez aucun il ne se montra la moindre pustule à la suite de cette réinoculation (3 juillet 1905). »

Des expériences faites à l'Institut vaccinal de Hambourg ont abouti aux résultats suivants (L. Voigt) : 1° la vaccination jen-

nérienne donne au mouton une immunité évidente, quoique faible; 2° les moutons vaccinés réagissent déjà après quelques mois à une revaccination. La vaccine se transmet de mouton à mouton, mais les pustules restent si insignifiantes qu'on ne peut s'en servir pour la préparation du vaccin.

Dans des essais d'inoculation de la clavelée au lapin, L. Voigt a obtenu, après quelques insuccès, un résultat positif. Mais le contenu des pustules inoculé à un veau et à un mouton donna de bonnes pustules sur le premier et de très petites lésions sur le second qui ne se montra d'ailleurs nullement immunisé contre la clavelée. Voigt conclut que le résultat était dû à une infection vaccinale à l'étable.

A. Roncal y Soria rappelle que la vaccination jennérienne des moutons comme mesure préventive contre la clavelée jouit d'une certaine faveur en Espagne. Ses expériences personnelles lui montrèrent que les moutons inoculés avec le vaccin jennérien ne résistent pas à l'épreuve de la clavelisation. L'inoculation de claveau à des génisses reste sans résultat. Toutefois, l'auteur obtient une réaction chez une génisse inoculée avec du claveau de chèvre; mais des moutons inoculés avec le virus repris sur cette génisse ne résistèrent pas, plus tard, à la clavelisation. Au contraire, des moutons qui avaient été inoculés avec le claveau de chèvre manifestèrent une immunité parfaite vis-à-vis de l'inoculation de claveau de mouton (Borrel et Konew).

Edm. Chaumier, reprenant ses expériences antérieures, n'obtient pas de résultat. Il n'en reste pas moins convaincu de la réalité de la transformation de la clavelée en vaccine, obtenue primitivement.

Enfin, tout dernièrement, H. A. Gins, revenant sur la question de l'immunisation anticlaveleuse au moyen de l'inoculation de vaccine, voit que la vaccine, inoculée par scarification de la peau, n'a aucune tendance à la généralisation et confère aux animaux une protection certaine contre l'infection claveleuse mortelle.

Il ressort de ces divers travaux une discordance telle dans les résultats qu'il est impossible de se faire une opinion sur les divers points envisagés : la vaccination jennérienne immunise-t-elle les moutons contre la clavelée? La clavelée est-elle

inoculable aux animaux, tels que la vache, le lapin, etc.? La clavelée immunise-t-elle contre la vaccine? Peut-on, par le moyen des inoculations à certaines espèces animales, transformer la vaccine en clavelée, ou la clavelée en vaccine? Telles sont les questions dont nous avons cherché une solution dans les expériences que nous allons exposer.

Il semble que la première question — la vaccination jennérienne immunise-t-elle les moutons contre la clavelée? — soit facile à résoudre, et l'on peut se montrer surpris des résultats si contradictoires obtenus par les différents expérimentateurs. On peut en dire autant de la troisième. Les deux autres nécessitent des conditions d'expérimentation qui n'ont certes pas toujours été réalisées. Pour être sûr, par exemple, de la nature claveleuse d'une réaction obtenue à la suite de l'inoculation de la clavelée à une génisse ou à un lapin, il faut être absolument à l'abri d'une contamination par le virus vaccinal. Et, malgré toutes les précautions prises par des expérimentateurs consciencieux et avertis, il n'est pas défendu de penser que certaines expériences ont pu être entachées d'erreur, ainsi que Voigt l'a admis lui-même pour l'une des siennes.

Nous nous trouvions aussi bien placés que possible pour entreprendre une étude de ce genre. Le laboratoire où nous avons effectué nos expériences est affecté à la préparation du « vaccin anticlaveleux de Bridré et Boquet », c'est-à-dire du « virus claveleux sensibilisé ». S'il sort chaque année de ce laboratoire plus d'un million de doses de vaccin anticlaveleux, il n'y entre pas un tube de vaccin jennérien. Aucune contamination n'est possible du fait de ce dernier virus. Seul existe le danger d'infection claveleuse, danger moins redoutable pour plusieurs raisons et moins grave dans ses conséquences, puisque le mouton seul est naturellement réceptif. D'autre part, les lots d'animaux peuvent être isolés dans des écuries séparées, éloignées même, et dont les ouvertures sont munies de toiles métalliques.

Pour éviter des répétitions dans l'exposé qui va suivre, nous avons désigné, sous des numéros d'ordre ou des lettres particulières, nos animaux d'expériences de façon à ne pas être obligés, lorsqu'un sujet d'expérience reparaît, de refaire son histoire complète.

I. — La vaccine chez le mouton. Passages du virus vaccinal de mouton à mouton.

5 Mars 1921. — Lot de 24 moutons neufs. On pratique sur tous ces moutons, en arrière du coude gauche, sur la partie du thorax dépourvue de laine et sur une petite surface épilée à la main, quatre scarifications verticales n'entamant autant que possible que l'épiderme, longues de 5 à 6 centimètres et espacées de 1 centimètre.

Le lot est divisé en 2 groupes :

A) 12 moutons. Les scarifications sont enduites de vaccin de génisse.

B) 12 moutons dont les scarifications, restant telles quelles, serviront de témoins.

L'activité du vaccin qui a servi à l'inoculation du groupe A est vérifiée par inoculation à un lapin.

Résultats. — A partir du 7 mars, quelques moutons du groupe A présentent un peu de rougeur au niveau des scarifications. La rougeur va en s'accentuant, les scarifications sont en relief et, en certains points, des pustules se forment (quatrième jour). Voici le résultat de l'inoculation aux 12 moutons du groupe A :

Mouton	1	++++	Mouton	7	+++
—	2	++++	—	8	++++
—	3	+		9	++++ ++++
—	4	++++	—	10	++++
—	5	++++	—	11	++++
—	6	++++	—	12	++++
—	7	++++			

(Le signe + indique une réaction; le nombre des signes est d'autant plus grand que le nombre des pustules est plus élevé. Nous continuerons dans la suite à nous servir de cette notation, en ce qui concerne les inoculations de « vaccine »; le signe — indiquera l'absence de réaction).

12 Mars. — Le virus vaccinal des moutons ci-dessus est inoculé, par scarifications, à un lapin L^1 et à un mouton M^1 :

Résultats. — Lapin L^1 : belle réaction spécifique;

Mouton M^1 : pas de réaction appréciable.

(L'inoculation au lapin, dans cette expérience et dans celles qui suivront, a pour but de s'assurer que le virus conserve son activité vis-à-vis du lapin et d'éviter l'erreur qui pourrait résulter d'une infection claveleuse accidentelle chez le mouton fournisseur de virus).

19 Mars. — Le même virus, conservé à la glacière depuis le 12, est inoculé à un lapin L^2 et à un mouton M^2 :

Résultats. — L^2 : belle réaction;

M^2 : une seule pustule.

24 Mars. — Le virus prélevé sur la pustule vaccinale de M^2 est inoculé, par scarifications, à un lapin L^3 et à un mouton M^3 :

Résultats. — L^3 : bonne réaction;

M^3 : une seule pustule, très nette.

31 Mars. — Du vaccin prélevé sur M^3 est inoculé, par quatre scarifications, à un mouton M^4 et par inoculation intradermique, à l'aiguille de Borrel, à deux moutons M^5 et M^6. Un lapin L^4 est inoculé par scarifications :

Résultats. — L^4 : bonne réaction;
M^4 : 3 pustules nettes;
M^5 et M^6 : Néant.

5 Avril. — Avec le virus vaccinal prélevé sur M^4 on inocule par scarifications M^5 (déjà inoculé sans succès à l'aiguille de Borrel) et un mouton neuf M^7 ainsi qu'un lapin L^5 :

Résultats. — L^5 : bonne réaction habituelle;
M^5 : plusieurs pustules;
M^7 : une seule pustule.

12 Avril. — Passage du virus vaccinal de M^7 sur M^8 et sur lapin L^6 :

Résultats. — L^6 : réaction habituelle;
M^8 : une belle pustule.

19 Avril. — Le virus prélevé sur M^8 est inoculé à M^6 (inoculé déjà, mais sans succès à l'aiguille de Borrel) par scarifications. En outre, une émulsion du produit de raclage de la pustule de M^8 est inoculée, à la seringue, dans le derme d'un mouton neuf M^9 :

Résultats. — M^6 : très belle réaction, nombreuses pustules; M^9 : ulcération qui ne paraît avoir aucun caractère vaccinal. Le pus est inoculé à un lapin, sans résultat.

Les pustules de M^6 sont curettées : on récolte 0 gr. 40 de pulpe qu'on triture avec un poids égal de glycérine. Le mélange est porté à la glacière.

7 Mai. — La pulpe glycérinée de M^6 est inoculée : 1° à un autre mouton M^{10} par voie intradermique; 2° M^{11} par voie sous-cutanée; 3° M^{12} par scarifications cutanées; 4° à un lapin L^7 par scarifications cutanées.

Résultats. — M^{10} : petit nodule;
M^{11} : nodule un peu plus volumineux (haricot);
M^{12} : très nombreuses pustules;
L^7 : belle réaction habituelle.

12 Mai. — On prélève par raclage de la pulpe vaccinale sur M^{12} et on la mélange à de la glycérine.

21 Mai. — Inoculation de M^{13} et d'un lapin L^8 par scarifications avec le virus de M^{12} :

Résultats. — L^8 : réaction habituelle;
M^{13} : cinq pustules.

Le 27 mai, les pustules de M^{13} sont curettées; la pulpe est diluée dans de la glycérine et conservée à la glacière.

30 Mai. — Passage (dixième) du virus vaccinal de M^{13} sur M^{14}, par scarifications :

Résultat. — Belles et nombreuses pustules. Le 6 juin, on prélève de la pulpe par raclage; elle est glycérinée et portée à la glacière.

13 Juin. — La pulpe de M^{14} est diluée dans 8 cent. cubes environ d'eau physiologique. La dilution est inoculée :

1° à M^{15} par scarifications ;
2° à Ma par injection sous-cutanée : 1/2 cent. cube ;
3° à Mb par injection sous-cutanée : 2 c. c. 1/2.
Résultats. — M^{15} : nombreuses pustules ;
Ma : grain de plomb sous-cutané ;
Mb : nodule de la grosseur d'un haricot.

En examinant successivement les résultats des inoculations par scarifications cutanées aux moutons, on remarque que l'éruption vaccinale augmente d'importance à mesure que le nombre de passages est plus grand. Cette constatation diffère de celles qui avaient été faites à l'Institut vaccinal de Hambourg où les pustules vaccinales du mouton étaient insignifiantes. Mais il faut tenir compte de deux facteurs : l'activité du vaccin de génisse employé et la réceptivité individuelle des sujets. Ainsi, dans notre première expérience (5 mars) les 12 moutons du groupe A n'ont pas présenté des réactions d'égale importance bien qu'ils aient été inoculés de la même façon avec le même vaccin.

Une inoculation de vaccin de génisse pratiquée le 15 juin, à deux moutons neufs M^{T} et $M^{T'}$ (témoins d'une expérience dont nous parlerons plus loin), donna les résultats suivants : M^{T} fit une éruption semblable à celle de M^{14} ou de M^{15} ; M^{T}, au contraire, présenta seulement quelques pustules.

Ces faits nous expliquent la dissemblance de résultats obtenus dans deux laboratoires, à la suite d'expériences pratiquées avec des vaccins d'activité inégale, sur des animaux de races différentes, entretenus dans des conditions différentes aussi.

II. — L'inoculation de la vaccine confère-t-elle au mouton l'immunité contre une nouvelle inoculation « vaccinale » ?

7 MAI 1921. — Les moutons suivants sont inoculés pour la seconde fois, par scarifications, avec du vaccin jennérien.

L'inoculation est pratiquée à gauche et à droite du thorax avec du vaccin de génisse :

Résultats de la réinoculation du 7 mai :

	A gauche	A droite
M^{1} Inoculé à gauche, *sans succès*, le 12 mars, avec du vaccin de passage	++++	++++ ++++
M^{2} Inoculé à gauche, le 19 mars, avec le même vaccin que M^{1} : *a présenté une pustule*.	+	++++

	A gauche	A droite
	—	—
M^4 Inoculé à gauche, le 31 mars, avec virus de M^3 : *a présenté trois pustules.*	—	++++
M^6 Inoculé à gauche, le 19 avril, avec virus de M^8 : a présenté une belle éruption vaccinale	—	—
M^9 Inoculé dans le derme, le 19 avril, avec virus de M^8 : a présenté un petit abcès non spécifique. .	+	—

Le mouton M^6 qui avait présenté, à la première inoculation, une belle éruption vaccinale, avait acquis l'immunité contre la vaccine. M^4 paraît avoir acquis une immunité locale.

Des expériences, pratiquées parallèlement sur des lapins ayant servi antérieurement à éprouver l'activité du vaccin employé dans nos diverses expériences, ont montré que ces lapins possédaient une immunité parfaite contre la vaccine :

Deux lapins inoculés une première fois, l'un le 10 avril, l'autre le 18 avril, sont inoculés, par scarifications, le 7 mai, avec le même vaccin qui a servi à éprouver les moutons de l'expérience ci-dessus. Les scarifications étaient pratiquées : 1° dans la région de la première inoculation ; 2° dans une région neuve. Ni l'un ni l'autre ne montra trace de réaction.

Toutefois, pour que les expériences sur les lapins soient tout à fait comparables à celles qui étaient pratiquées sur les moutons, nous avons inoculé deux lapins, le 15 juin, par une simple éraflure épidermique de façon que l'inoculation donne naissance à une pustule unique. Le résultat fut obtenu sur l'un des lapins; l'autre eut 2 pustules. A l'épreuve, pratiquée le 4 juillet, le premier lapin présenta quelques petites papules, sans pustules; le second, rien. Un témoin fit une éruption magnifique. Le lapin paraît donc acquérir une immunité plus solide que celle que nous avons observée chez le mouton à la suite de légères éruptions vaccinales.

III. — L'inoculation de la vaccine confère-t-elle au mouton l'immunité contre la clavelée?

19 Mars 1921. — 6 moutons du groupe A, inoculés le 5 mars avec du vaccin de génisse (voir ci-dessus) et 6 moutons du groupe témoin B — neufs par conséquent — sont *clavelisés* au vaccinostyle.

Résultats. — (Le signe — indique l'absence de réaction visible : lorsqu'il y a réaction, celle-ci est représentée par un point ou un cercle d'autant plus grands que la réaction était plus importante).

Groupe A	Mouton n° 2	O	Groupe B	Mouton n° 1	•
	— 3	—		— 2	•
	— 5	•		— 3	o
	— 8	o		— 4	•
	— 10	—		— 5	o
	— 11	o		— 6	O

30 Mars. — Les moutons restants des deux groupes A et B sont *clavelises* à l'aiguille de Borrel.

Résultats :

Groupe A	Mouton n° 1	•	Groupe B	Mouton n° 7	—
	— 4	o		— 8	O
	— 6	•		— 9	•
	— 7	o		— 10	•
	— 9	o		— 11	O
	— 12	—		— 12	o

On remarque qu'à la suite des clavelisations du 19 et du 30 mars trois moutons du groupe A et un du groupe B n'ont pas présenté de réaction locale. Dans les expériences pratiquées sur les moutons algériens, il se trouve toujours une certaine proportion d'animaux qui résistent à l'inoculation claveleuse, manifestant ainsi une immunité parfaite, conséquence de l'endémicité de la clavelée (immunité acquise dans l'utérus de la mère, ou à la suite d'une atteinte légère). Il faut tenir compte de cette observation dans l'appréciation des résultats d'expériences. L'absence de réaction à la clavelisation d'épreuve n'implique pas toujours une immunisation récente due à l'inoculation dont on veut apprécier l'effet.

La comparaison des résultats obtenus dans les groupes A et B montre que *l'inoculation de la vaccine par scarifications épidermiques n'avait pas conféré aux moutons l'immunité contre la clavelée.*

7 Mai. — 4 moutons inoculés avec du vaccin jennérien prélevé sur des moutons (virus de passage) sont *clavelisés* à l'aiguille de Borrel.

Résultats le septième jour :

M³ (avait présenté une belle pustule vaccinale) : **o**
M⁵ (avait présenté plusieurs pustules vaccinales) : clavelisé des 2 côtés : à gauche, **o**; à droite, **o**.
M⁶ (avait présenté une pustule vaccinale) : **o**.
M⁸ (avait présenté une belle pustule vaccinale) : —.

Sur ces quatre moutons, un seul n'a pas réagi à la clavelisa-

tion d'épreuve; *les trois autres ont fourni des réactions dont l'importance dénote une parfaite réceptivité.*

21 Mai. — Les moutons M^{10} et M^{11}, qui ont réagi par des nodules à l'inoculation intradermique (M^{10}) ou sous-cutanée (M^{11}) de vaccin jennérien, sont *clavelisés*, des deux côtés, en même temps qu'un témoin Mt.

Résultats, le septième jour :

M^{10}.	à gauche	•	à droite	•
M^{11}.	—	•	—	•
M^{t}	—	o	—	o

Au toucher, on perçoit chez M^{10} et M^{11} une très petite induration au niveau de la piqûre. Ces moutons ont-ils été immunisés par les inoculations du vaccin jennérien?

Devant ce résultat, de nouvelles expériences étaient nécessaires :

30 Mai. — 1° Inoculation sous-cutanée de pulpe vaccinale, prélevée sur M^{13}, à 2 moutons Mm et Mm'.

Résultats. — Mm : • (grain de plomb sous-cutané); Mm' : —;

2° Inoculation sous-cutanée de pulpe vaccinale (de génisse) à deux moutons Mv, Mv'; on injecte presque entièrement le contenu d'un tube de 40 doses de vaccin, dilué dans 10 cent. cubes d'eau : 5 cent. cubes à chaque mouton.

Résultats. — Mv : **o**; Mv' : **o**.

(Gros noyaux sous-cutanés de la grosseur d'une noisette.)

13 Juin. — I. Inoculation sous-cutanée de pulpe de M^{11} diluée :
1° à un mouton Ma, de 1/2 cent. cube de dilution;
2° à un mouton Mb, de 2 c. c. 1/2 de dilution.

Résultats. — Ma : • (grain de plomb) ; Mb : **o** (haricot).

II. — Inoculation de pulpe vaccinale de génisse diluée : 40 doses dans 10 cent. cubes d'eau physiologique :
1° à un mouton Mc, de 1/2 cent. cube de dilution;
2° à un mouton Md, de 3 c. c. 1/2 de dilution.

Résultats. — Mc : —; Md : •

27 Juin. — Les moutons ci-dessus, qui ont été inoculés sous la peau avec du vaccin de passage ou avec du vaccin de génisse, sont *clavelisés* en même temps que deux moutons témoins neufs.

Résultats :

Mm.	•	Mb	O
Mm^2	O	Mc	—
Mv	o	Md	•
Mv^2.	•	Témoin 1. .	O
Ma	O	— 2. .	—

Les inoculations sous-cutanées de vaccin antivariolique n'ont donc pas conféré aux moutons l'immunité contre la clavelée.

IV. — La vaccine peut-elle être transformée en clavelée ?

Les expériences de passage du virus vaccinal chez le mouton nous ont montré que l'éruption consécutive à l'inoculation par scarifications cutanées conserve, même après une douzaine de passages, les caractères de l'éruption « vaccinale ». Que cette éruption soit réduite à quelques pustules isolées ou qu'elle se traduise par l'évolution de pustules nombreuses et confluentes, rien, dans cette réaction, ne rappelle la lésion claveleuse. Nous avons vu, d'ailleurs, qu'une réaction vaccinale, même très intense, n'immunise pas contre la clavelée. Il en serait autrement si le virus vaccinal, du fait de son adaptation à l'organisme du mouton, se transformait en virus claveleux.

Les expériences du 21 mai (III), portant sur des moutons inoculés de vaccin par la voie sous-cutanée, laissaient un doute dans l'esprit : les moutons M^{10} et M^{11} avaient manifesté à la clavelisation d'épreuve une immunité indéniable. Cette immunité était-elle due à l'inoculation de la vaccine ou bien, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, avions-nous affaire à deux moutons immunisés contre la clavelée ? Les expériences ultérieures des 30 mai, 13 et 29 juin répondent à la question : les moutons inoculés sous la peau avec du vaccin antivariolique n'acquièrent pas, de ce fait, l'immunité contre la clavelée ; les moutons M^{10} et M^{11} étaient naturellement immuns.

Le 28 juin, du virus vaccinal de onzième passage est inoculé, en même temps, à un mouton Mb et à un lapin. Les deux animaux présentent, le cinquième jour après l'inoculation, une belle éruption. Le virus vaccinal, tout en prenant pour le mouton une virulence qui se manifeste par une régularité dans l'éruption consécutive, garde sa virulence vis-à-vis du lapin.

Est il permis, après une douzaine de passages, de conclure à l'impossibilité de la transformation du virus vaccinal en virus claveleux ? Evidemment non. Nous continuerons les passages, et, si des faits nouveaux viennent à se produire, nous nous empresserons de les faire connaître. Nous nous bornerons, pour l'instant, à dire que si cette transformation est réalisable, elle ne peut être obtenue en un court espace de temps par les moyens utilisés dans nos expériences.

V. — La clavelée est-elle inoculable à des espèces autres que l'espèce ovine? Peut-elle être transformée en vaccine?

La première de ces questions a préoccupé plusieurs auteurs. Nous avons vu que Marchelli, puis Sacco, pensaient pouvoir vacciner des enfants avec le virus claveleux. Edm. Chaumier est aussi de cet avis. Ce même auteur a inoculé, avec succès, la clavelée à une vache, à une chèvre et à un âne. L. Voigt a obtenu, une fois, un résultat positif en inoculant la clavelée au lapin; mais Voigt a pensé que le succès de l'inoculation était dû à une infection vaccinale à l'étable. Nous avons répété quelques-unes de ces expériences.

6 Avril. — La pellicule superficielle de la pustule claveleuse du mouton n° 8, groupe B (III) est prélevée, broyée et inoculée :

1° à un lapin X, par scarification;
2° à un lapin V, par piqûres à l'aiguille de Borrel;
3° à deux moutons, à l'aiguille de Borrel.

Résultats. — Néant.

Ce résultat négatif, même chez les moutons, n'est pas pour nous surprendre; on a pu, d'une part, avoir affaire à des animaux immuns; d'autre part, nous savons, par des expériences bien antérieures, que la pellicule superficielle des pustules claveleuses n'est pas d'une virulence très régulière.

16 Avril. — On inocule parallèlement à des moutons et à des lapins : 1° de la pulpe claveleuse du 14 avril (tissu œdématié, broyé au broyeur Latapie puis au broyeur de Chalybäus); 2° du claveau (lymphe claveleuse) de même date, et, 3° du tissu de raclage superficiel de pustule claveleuse formant eschare :

Résultats :

a) Pulpe claveleuse du 14 avril :

Inoculation :	2 moutons, à l'aiguille de Borrel.	O —
—	1 lapin E, par scarification . . .	• Petit durillon après rougeur
—	1 lapin F, à l'aiguille de Borrel.	—

b) Claveau du 14 avril :

Inoculation :	2 moutons, à l'aiguille de Borrel.	O O
—	1 lapin G, par scarification . . .	—
—	1 lapin H, à l'aiguille de Borrel.	—

c) Raclage de pustule (partie superficielle et croûtes).

Inoculation :	4 moutons, à l'aiguille de Borrel.	— — — O
—	1 lapin I, par scarifications . . .	— Légère rougeur.
—	1 lapin J, à l'aiguille de Borrel.	—

Le petit durillon observé chez le lapin E est broyé; le produit de broyage sert à enduire les scarifications pratiquées sur un lapin neuf :

Résultat. — Néant.

19 Avril. — Un lapin T est rasé sur le dos et quatre scarifications sont pratiquées sur la surface rasée. On inocule 8 c. c. 5 de claveau pur du 14 avril, *dans la veine* marginale de l'oreille.

Un lapin U est rasé et la surface rasée est scarifiée de la même façon. *Les scarifications sont enduites de claveau.* En outre, le lapin reçoit, comme T, 0 c. c. 5 de claveau *dans la veine* marginale.

Le 22 avril, U présente une très légère rougeur le long des scarifications.

Le 25 avril, aucune trace de réaction chez les deux lapins.

28 Avril. — Deux lapins, Lp et Lp′, sont rasés et la surface rasée scarifiée. Les scarifications sont enduites de pulpe claveleuse fraîche (recueillie le jour même).

Un lapin Lt reçoit dans le testicule droit quelques gouttes de claveau du 21 avril.

Le 30 avril, rougeur de la peau rasée chez Lp et Lp′; Lt, pas de réaction apparente.

Le 2 mai, Lp′ présente : rougeur, surélévation de l'épiderme et croûtes sèches. L'enlèvement des croûtes montre un suintement des parties sous-jacentes.

Lp présente une réaction beaucoup plus faible.

Les croûtes de Lp′ et la sérosité qu'elles recouvrent sont reportées sur des scarifications pratiquées sur un lapin neuf :

Résultat. — Néant.

22 Avril. — 1° Inoculation sous-cutanée de 2 cent. cubes de claveau pur sous la peau rasée du dos d'un lapin Q ;

2° Même inoculation à un lapin R, les 2 cent. cubes de claveau étant dilués dans 18 cent. cubes d'eau physiologique.

Un lapin témoin S a la peau rasée, mais n'est pas inoculé :

Résultats. — Lapin Q : néant;
Lapin R : très léger œdème, puis un peu d'induration;
Lapin S : néant.

Ainsi, l'*inoculation de la clavelée au lapin n'a pas déterminé de réaction nette et les tentatives de passage de virus de lapin à lapin ont complètement échoué.*

23 Avril. — Une génisse et une jeune chamelonne sont inoculées, à gauche, avec du claveau pur du 21 avril, par : 3 scarifications, 3 piqûres à l'aiguille de Borrel et une injection sous-cutanée de 0 c. c. 5 :

Résultats. — Génisse : néant;
Chamelonne : léger œdème diffus sur toute la partie rasée et petit nodule au point d'inoculation sous-cutanée.

29 Avril. — La même génisse, un veau, la même chamelonne et une chèvre sont inoculés (à droite) par scarifications, et sous la peau, avec 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 4 dans l'eau physiologique, de pulpe claveleuse du 28 avril :

Résultats. — Les scarifications n'ont donné lieu à aucune réaction.
L'inoculation sous-cutanée a été suivie :
Chez la génisse : d'un faible nodule;
Chez le veau : d'un faible nodule;
Chez la chamelonne : néant;
Chez la chèvre : d'une induration adhérente à la peau qui participe à la réaction.

7 Mai. — On prélève du tissu de réaction chez la chèvre et, après l'avoir haché et broyé, on l'inocule, par scarifications, à un veau neuf et à un mouton :

Résultats. — Veau : néant;
Mouton : nodule cutané.

Dans les tentatives d'inoculation de la clavelée aux animaux ci-dessus, la seule qui ait abouti à un résultat vraiment positif est l'inoculation à la chèvre, ce qu'on savait possible depuis les travaux de Borrel et Konew, mais, contrairement à ce qu'avait obtenu Edm. Chaumier, le virus de cette chèvre, reporté sur un veau, n'a provoqué aucune réaction locale.

Il restait à savoir si les petits nodules observés chez le veau à la suite de l'injection sous-cutanée de pulpe claveleuse étaient dus au virus claveleux ou simplement au tissu étranger injecté.

9 Mai. — Le veau qui avait présenté un petit nodule consécutif à l'injection du 29 avril est inoculé sous la peau avec 1 cent. cube de claveau pur :

Résultat. — Après quatre jours, on perçoit un très petit nodule (grain de plomb) au point d'inoculation.

24 Juin. — La génisse inoculée le 29 avril et le veau déjà inoculé 2 fois, le 29 avril et le 7 mai, et la chamelonne, reçoivent, sous la peau, 1 cent. cube de tissu testiculaire de mouton (le tissu a été broyé, dilué, de la même façon que la pulpe claveleuse injectée le 29 avril) :

Résultat. — Les trois animaux présentent un nodule sous-cutané de la grosseur d'un haricot.

Deux moutons qui reçoivent la même quantité de tissu testiculaire ne réagissent pas.

Ainsi, que les animaux ci-dessus aient reçu du tissu virulent ou du tissu normal de mouton, ils présentent, dans la suite, un nodule sous-cutané au point d'injection. La réaction est due au tissu étranger injecté et n'a rien de spécifique. Nous devons tirer des expériences ci-dessus la conclusion que la clavelée n'est pas inoculable aux animaux employés dans nos expériences, mouton et chèvre exceptés. Les tentatives d'inoculation

ne sont suivies d'aucune lésion spécifique qui permette de reprendre du virus et de le reporter sur un animal neuf. Comment, dans ces conditions, envisager la possibilité d'une transformation?

VI. — La clavelée immunise-t-elle contre la vaccine?

EXPÉRIENCES SUR LE MOUTON.

Les premières expériences devaient évidemment porter sur l'animal éminemment réceptif au virus claveleux, le mouton.

A. — *Moutons immunisés contre la clavelée, par l'inoculation sous-cutanée de virus claveleux sensibilisé.*

Au moment où nous commencions ces recherches, nous possédions un certain nombre de moutons qui avaient servi aux essais de plusieurs échantillons de vaccin anticlaveleux sensibilisé. Nous avons éprouvé la résistance de ces moutons vis-à-vis de l'inoculation du vaccin jennérien : des scarifications étaient pratiquées en arrière du coude gauche pour le lot *a* et, de chaque côté, pour les lots *b*, *c* et *d*.

5 MARS 1921. — Quatre scarifications sont pratiquées sur les moutons du lot *a* (côté gauche); deux scarifications de chaque côté pour les autres lots :

Résultats de l'inoculation du vaccin jennérien:

Vaccin anticlaveleux sensibilisé		A GAUCHE scarifications				A DROITE scarifications	
		1re	2e	3e	4e	1re	2e
Lot *a*, 28 janvier	Mouton 1 avait reçu 1 dose	—	+	—	+	»	»
	— 2 — 1 —	+	+	—	—	»	»
	— 3 — 20 —	—	—	—	+	»	»
Lot *b*, 7 février	— 1 — 1 —	—	—			—	—
	— 2 — 1 —	+	+			—	—
	— 3 — 20 —	—	—			—	—
Lot *c*, 12 février	— 1 — 1 —	+	+			+	+
	— 2 — 1 —	+	—			—	+
	— 3 — 20 —	—	—			—	—
Lot *d*, 19 février	— 1 — 1 —	—	—			+	+
	— 2 — 1 —	—	—			—	—
	— 1 — 20 —	—	—			—	—

Si l'on compare ces résultats avec ceux qui ont été obtenus sur les moutons neufs inoculés à la même date (groupe A, I)

avec le même vaccin de génisse, on constate que les réactions des moutons ci-dessus sont moins importantes que celles des moutons du lot A. En s'en tenant à cette seule constatation, on serait tenté de conclure à une légère immunité acquise contre la vaccine par le fait de l'inoculation antérieure de vaccin anticlaveleux sensibilisé. Mais, dans les inoculations vaccinales des moutons du groupe A et des moutons de l'expérience ci-dessus, si le vaccin utilisé était le même, les animaux étaient de provenances diverses et la réceptivité individuelle devait vraisemblablement jouer un rôle qu'on ne saurait négliger.

Des expériences ultérieures ont montré que cette réserve s'imposait :

15 Juin. — Trois moutons qui ont servi aux essais du vaccin anticlaveleux sensibilisé, le 7 juin (vaccin anticlaveleux n° 111) sont inoculés, par scarifications, des deux côtés du thorax, en même temps que deux moutons neufs, témoins, avec du *vaccin de génisse*.

Résultats de l'inoculation vaccinale du 15 :	A gauche	A droite
Vaccin anticlav. sensibilisé		
Mouton n° 1 avait reçu 1 dose à gauche, le 7 juin.	++++ ++++	++++ ++++
— 2 — 1 —	++++	++++
— 3 — 22 —	++++ ++++	++++ ++++ (1)
Mouton témoin MT	++++	++++
— MT'.	+++	++

(Les témoins étaient plus jeunes et n'appartenaient pas au même lot d'achat que les trois autres sujets.)

Ici, la conclusion à tirer serait tout opposée à celle qui semblait découler de l'expérience précédente. Les sujets immunisés contre la clavelée se sont montrés plus réceptifs que les témoins à l'inoculation de la vaccine. Il faut, toutefois, tenir compte du fait que l'épreuve de l'inoculation vaccinale a été faite huit jours seulement après l'injection de virus claveleux sensibilisé.

4 Juillet. — Six moutons qui ont servi aux essais des vaccins anticlaveleux n°s 112 et 113, le 18 juin, sont inoculés, par scarifications, sur le côté droit du thorax (Tous ces moutons avaient présenté une réaction locale à la suite de la vaccination anticlaveleuse).

(1) Très fortes et très nombreuses pustules.

Résultats de l'inoculation vaccinale du 4 juillet :

Mouton n° 1	avait reçu 1 dose de vaccin anticlav. n° 112, le 18 juin.						++++
—	2	—	2	—	—	—	+++
—	3	—	22	—	—	—	++++
—	4	—	1	—	n° 113,	—	++++
—	5	—	1	—	—	—	++++ ++++
—	6	—	22	—	—	—	++++
Mouton témoin n° 1	. . . .						++++
—	2						++++ ++++

Comme il s'est écoulé seize jours entre l'inoculation de vaccin anticlaveleux et l'inoculation de vaccin de génisse, l'immunité vis-à-vis de la vaccine qui eût pu être la conséquence de la première inoculation avait eu le temps de s'établir. *L'expérience montre que les moutons immunisés contre la clavelée avaient conservé leur réceptivité vis-à-vis de la vaccine.*

B. — *Moutons immunisés contre la clavelée, par clavelisation.*

25 Avril. — Les moutons ci-dessous sont inoculés avec du vaccin de génisse, par scarifications.

Résultats de l'inoculation vaccinale du 25 avril :

Un mouton clavelisé le 30 mars.	4 pustules vaccinales dont 2 très grosses;
Un 2e mouton clavelisé même date	Plusieurs pustules;
Un mouton clavelisé le 6 avril. .	Pustules nombreuses, confluentes;
— 16 avril. .	Une petite pustule;
Un mouton neuf témoin.	6 pustules dont 3 grosses.

(Les quatre moutons clavelisés avaient réagi très fortement à la clavelisation par de fortes pustules et des eschares cutanées.)

On peut hardiment conclure de ces résultats que *la clavelisation n'avait conféré aux moutons aucune immunité contre la vaccine.*

C. — *Moutons immunisés passivement contre la clavelée, par une injection de sérum anticlaveleux.*

23 Avril. — Deux moutons reçoivent sous la peau 8 cent. cubes de sérum anticlaveleux. Deux autres moutons reçoivent 10 cent. cubes du même sérum.

(A la dose de 6 cent. cubes le sérum employé immunise le mouton contre l'inoculation intradermique ou sous-cutanée de virus claveleux, empêche l'apparition d'une lésion locale.)

25 Avril. — Sont inoculés par scarifications, avec du vaccin de génisse :

Un mouton à	8 c.c. de sérum. . .	6 petites pustules;
—	10 — . . .	Pustules nombreuses et confluentes;

Sont clavelisés à l'aiguille de Borrel :

Un mouton à 8 c.c. de sérum.	—
— 10 —	—
Un mouton neuf témoin	O

Le sérum anticlaveleux, qui protège sûrement le mouton contre la clavelée, ne le protège nullement — à des doses voisines de la dose minima — contre la vaccine. De plus fortes doses seraient-elles plus efficaces?

25 Juin. — Un mouton S reçoit, sous la peau du flanc droit, 110 cent. cubes de sérum anticlaveleux. Le même sujet est inoculé en même temps, du côté gauche, avec du vaccin de génisse. Deux témoins neufs sont inoculés de la même façon avec le vaccin de génisse, mais ne reçoivent pas de sérum anticlaveleux :

Résultats. — M S : pustules assez nombreuses;
M témoin n° 1 : nombreuses pustules;
M' témoin n° 2 : nombreuses pustules.

D. — *Moutons hyperimmunisés contre la clavelée* (fournisseurs de sérum anticlaveleux).

Ces moutons, hyperimmunisés par des injections périodiques de virus claveleux, font partie d'un troupeau qui fournit, depuis plusieurs années, le sérum anticlaveleux qui a servi à l'expérience ci-dessus. Si le virus claveleux est capable de conférer au mouton une certaine immunité contre la vaccine, cette immunité doit être particulièrement appréciable chez ces sujets.

25 Juin. — Deux moutons sont inoculés de vaccine en même temps que les moutons de l'expérience ci-dessus :

Résultats. — 1er mouton : plusieurs pustules;
2e mouton : nombreuses pustules.

Dans ces deux derniers groupes d'expériences, l'injection de sérum anticlaveleux, pas plus que l'immunité anticlaveleuse à toute épreuve des moutons hyperimmunisés, n'ont été capables d'empêcher la réaction vaccinale et la production des pustules. Sur le mouton traité par 110 cent. cubes de sérum et sur l'un des moutons hyperimmunisés, l'éruption s'est montrée plus discrète, il est vrai, que sur les témoins, mais le fait que l'autre mouton hyperimmunisé a montré une éruption semblable à

celle des témoins nous porte à croire que les différences de réaction chez ces divers animaux tiennent plus à la réceptivité particulière des sujets qu'à l'injection de sérum anticlaveleux qu'ils ont subie, ou à l'immunité anticlaveleuse qu'ils possèdent. (On sait que le sérum anticlaveleux s'est montré également incapable de protéger l'homme contre la variole. — Expériences du professeur Alezais, à l'hôpital de la Conception, à Marseille, citées par R. Durand.)

Expériences sur des animaux autres que le mouton.

Les animaux non réceptifs vis-à-vis de la clavelée peuvent-ils acquérir une certaine immunité contre la vaccine à la suite d'une inoculation de virus claveleux?

7 Mai. — Les lapins suivants sont inoculés avec du vaccin de génisse sur des scarifications pratiquées : 1° au niveau du point d'inoculation antérieur; 2° dans une région neuve.

Résultats de l'inoculation vaccinale du 7 mai :

		Région des anciennes scarifications	Région neuve
		—	—
Lapin E. . .	Légère réaction à la suite de l'inoculation de *pulpe claveleuse* fraîche, le 16 avril	+++	+++
Lapin I. . .	Légère réaction à la suite de l'inoculation de *raclage de pustules claveleuses*, le 16 avril	++++	++++
Lapin Lp . .	Réaction à la suite de l'inoculation de pulpe claveleuse, le 28 avril. . . .	+++	+++
Lapin Lp'. .	Légère réaction dans les mêmes conditions que Lp	+++	+++
Lap. vacciné	Vaccin de génisse, le 10 avril	—	—
—	Vaccin de génisse, le 18 avril	—	—
Lapin neuf .	. . . .	++++	++++

Cette expérience montre : d'une part, que les lapins inoculés antérieurement avec du vaccin jennérien ont acquis l'immunité parfaite contre la vaccine; d'autre part, que l'inoculation de la clavelée, même suivie d'une légère réaction, ne confère pas au lapin l'immunité contre la vaccine.

9 Mai. — La génisse et la chamelonne, inoculées à deux reprises avec du virus claveleux, sont inoculées avec du vaccin de génisse par des scarifications pratiquées : 1° au niveau des anciennes scarifications; 2° dans une région neuve :

Résultats. — La génisse présente de belles pustules vaccinales sur les deux surfaces inoculées;

La chamelonne présente une réaction nette, avec pustules, dans la région des anciennes scarifications : réaction nulle dans la région neuve.

L'inoculation claveleuse n'avait donc pas conféré à ces deux animaux l'immunité contre la vaccine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les deux maladies, vaccine et clavelée, présentent des caractères cliniques communs. Elles ont avec la variole une ressemblance suffisamment marquée pour qu'on ait désigné la première sous le nom de variole de la vache (cow-pox), la seconde sous le nom de variole ovine (sheep-pox), ces appellations paraissant indiquer que ces trois affections ne sont que des manifestations différentes, des adaptations, d'un même virus. En ce qui concerne la vaccine et la clavelée, dont nous nous occupons seulement ici, il y a bien, dans les lésions magistralement étudiées et décrites par Borrel, quelques différences anatomo-pathologiques, mais ces différences ne semblent pas, au point de vue envisagé, d'une importance capitale. Les virus, inconnus morphologiquement, ont des propriétés communes : faculté de traverser les filtres, dans certaines conditions; sensibilité à la chaleur, à la lumière, aux antiseptiques. (Il faut remarquer, toutefois, que, d'une façon générale, le virus claveleux se montre plus sensible que le virus vaccinal à l'action de ces divers agents de destruction.) Les différences s'accusent lorsqu'on examine l'action pathogène; alors que la vaccine est inoculable à un grand nombre d'espèces animales, la clavelée ne frappe spontanément que le mouton et n'est inoculable expérimentalement qu'au mouton et à la chèvre. Si on applique à ces virus l'épreuve de l'immunisation croisée, la différenciation devient alors des plus nettes.

D'où vient donc la discordance entre les résultats obtenus par les divers expérimentateurs? De la façon d'expérimenter et du milieu dans lequel ceux-ci opèrent. Sacco manipulait les deux virus en même temps, inoculant la clavelée à un enfant, la vaccine à un autre, ou bien, inoculant le même enfant à un

bras avec le virus claveleux, à l'autre bras avec le virus vaccinal. Sacco faisait ses expériences en 1809. Dans quelles conditions et avec quelles garanties d'exactitude? Edm. Chaumier, L. Voigt opèrent dans des Instituts vaccinaux où les chances de contamination par la vaccine sont multiples; L. Voigt attribue l'unique succès obtenu dans les tentatives d'inoculation de la clavelée au lapin à une infection vaccinale accidentelle à l'étable.

Nous sommes naturellement portés à croire que, malgré toutes les précautions qu'ait pu prendre un savant consciencieux, la même cause d'erreur s'est glissée dans les expériences de Edm. Chaumier.

Parmi les expériences entreprises par la « Société centrale établie pour l'extinction de la petite vérole en France par la propagation de la vaccine » et rappelées par R. Durand dans sa thèse, celles qui avaient trait, avons-nous dit, à l'immunisation contre la clavelée par l'inoculation de la vaccine, fournirent des résultats si contradictoires que la Commission chargée de formuler son avis n'osa se prononcer. A côté des résultats nettement défavorables, d'autres plus heureux avaient été enregistrés, mais les essais n'avaient porté que sur des lots trop minimes et il ne semble pas que, dans toutes ces expériences, on ait eu recours à des sujets « témoins ». La conclusion de la Commission était d'ailleurs fort sage : « Quoique nous ayons mis dans nos expériences, écrivait-elle, toute la sévérité possible, nous pensons qu'il serait nécessaire d'en tenter de nouvelles, sur un plus grand nombre d'individus, afin de pouvoir asseoir un jugement quelconque sur un fait aussi important. Notre opinion à cet égard est d'autant mieux fondée qu'il est d'observation que souvent on voit dans un troupeau, composé de sept à huit cents bêtes, deux à trois cents braver la clavelée qui exerce ses ravages sur les autres; or, si ces trois cents ne la contractent pas, quoique vivant dans la contagion, il est évident que les épreuves faites sur douze ne sont pas suffisantes pour résoudre la question ». La clavelée était fréquente en France à l'époque où opérait la Commission et les animaux manifestant une immunité naturelle contre la clavelée devaient être assez nombreux. L'observation de la Commission se trouve confirmée par celle que nous faisions plus haut sur

l'endémicité de la clavelée en Algérie. D'autre part, le fait signalé dans les essais considérés comme favorables à la méthode, que des animaux vaccinés avaient réagi à l'inoculation claveleuse par une simple lésion locale, ne prouve nullement une immunisation consécutive à l'inoculation du vaccin de génisse. Ce fait est une règle, même parmi les moutons neufs. Il est le principe même de la « clavelisation », la vieille méthode prophylactique qui n'eût pas connu le succès que l'on sait si l'infection générale du mouton clavelisé n'avait été, somme toute, qu'un cas exceptionnel.

Les expériences de Gins tendent à montrer que l'inoculation de la vaccine préserve le mouton de l'infection claveleuse mortelle. Les faits rapportés par Gins seraient-ils confirmés et étendus, il n'en resterait pas moins vrai que cette inoculation est incapable de préserver, simplement, le mouton de l'infection. Une bonne méthode prophylactique doit répondre à d'autres exigences. En ce qui concerne la clavelée, cette méthode existe : c'est « la vaccination par le virus claveleux sensibilisé » dont il a été question au cours de ce travail. De ce fait, l'intérêt pratique de recherches analogues à celles que nous venons de rapporter se trouve bien amoindri.

En résumé, que l'on admette entre le virus de la vaccine et celui de la clavelée une communauté d'origine, c'est une opinion soutenable à laquelle nous nous garderons de contredire. Mais nous sommes obligés de constater que, jusqu'à présent, aucune de nos expériences tendant à établir cette parenté n'a atteint son but. Il ne nous a pas été plus possible de transformer la clavelée en vaccine, que la vaccine en clavelée. Cette dernière est restée maladie du mouton et l'autre, même transportée sur le mouton, a gardé ses caractères propres.

Nous nous bornerons donc à formuler quelques conclusions qui nous paraissent découler logiquement des recherches que nous venons d'exposer.

1° La vaccine est inoculable au mouton. Le mouton peut être utilisé pour la culture en série *in vivo* et pour la production du virus vaccinal.

2° L'inoculation de la vaccine protège le mouton contre les effets d'une nouvelle inoculation de vaccine (au moins pour un

certain temps), à la condition que la première inoculation ait été suivie d'une réaction suffisante.

3° La vaccine n'immunise pas le mouton contre la clavelée.

4° La clavelée n'immunise pas le mouton contre la vaccine. On peut ajouter que l'inoculation de virus claveleux à d'autres animaux que le mouton n'immunise pas davantage ceux-ci contre la vaccine.

5° Les virus de la vaccine et de la clavelée se sont comportés, dans nos expériences, comme deux virus bien différenciés.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

BIBLIOGRAPHIE

A. Borrel, Epithélioses infectieuses et épithéliomas. Ces *Annales*, **17**, 1903, p. 81.

J. Bridré et A. Boquet, Vaccination contre la clavelée par virus sensibilisé. Ces *Annales*, **27**, 1913, p. 797.

Edm. Chaumier, Enquête au sujet de la parenté de la clavelée et de la vaccine. *Revue intern. de la vaccine*, 1920, p. 99.

— Note sur la transformation de la clavelée du mouton en vaccin jennérien. *Imprimerie tourangelle*, 1905. *Revue intern. de la vaccine*, 1911-1912, p. 111; *Ibid.*, 1920, p. 181.

R. Durand, De la sérothérapie dans la variole. *Thèse*, Paris, 1907, Anal. *in Revue intern. de la vaccine*, 1920, p. 184.

H. A. Gins, Versuche über Vakzination der Schafe (Expériences avec la vaccine sur le mouton) *Zeitschr. f. Hyg.*, 90, 1920, p. 322.

G. Martin et M. Léger, La vaccination aux colonies. *Traité de Pathologie exotique*, Paris, Baillière et fils, anal. *in Revue intern. de la vaccine*, 1920, p. 127.

Adolfo Roncal y Soria, La vacuna de ternera y el virus ovino atenuado por pases en la cabra preservativos de la viruela ovina. *Revista de higiene y sanidad veterinaria*, 20 mai 1915; *Revue intern. de la vaccine*, 1920, p. 203.

Luigi Sacco, La variole des moutons. Milano 1809. *Revue intern. de la vaccine*, 1920, p. 171.

L. Voigt, Expériences faites à l'Institut vaccinal de Hambourg. *Revue intern. de la vaccine*, **1**, 1910-1911, p. 381.

SUR LA VACCINATION ANTIBARBONIQUE PAR VIRUS ATTÉNUÉ

par F. D'HÉRELLE et G. LE LOUET.

La méthode de vaccination pastorienne par virus atténués a été préconisée à diverses reprises contre le barbone, elle n'a cependant jamais été appliquée; il semble donc qu'une difficulté a dû se présenter dans la pratique. Au cours de recherches sur cette maladie, les circonstances nous ont permis de préciser cette difficulté et de trouver le moyen d'y parer.

Nous avions à notre disposition, outre diverses souches extrêmement virulentes de la bactérie du barbone, isolées au cours d'épizooties indochinoises, une souche remise à l'un de nous par M. Stassano, souche supposée virulente, provenant d'une épizootie italienne; elle était entretenue depuis fort longtemps dans les laboratoires et avait subi de nombreux passages par lapins. Nous possédions cette souche sous deux formes :

A. En sang de lapin; sang du cœur d'un lapin, mort après inoculation, conservé en ampoules scellées depuis seize mois;

B. En bouillon de bœuf (préparé suivant la méthode de Martin); culture ensemencée avec le sang de ce même lapin au moment de la nécropsie et conservée depuis lors en ampoules.

Un taurillon (1) ayant résisté à l'inoculation de 5 cent. cubes d'une culture de dix-huit heures de la souche Italie (ensemencée avec une goutte du sang de lapin conservé en ampoule, A), tandis qu'un taurillon témoin succomba à la suite de l'injection de 1/5.000 de cent. cube d'une culture ensemencée avec du sang d'un buffle mort de barbone, nous

(1) Tous les taurillons ayant servi aux expériences étaient âgés de douze à seize mois; les bufflons, de dix-huit mois à deux ans.

en avons conclu que la souche Italie était en réalité une souche atténuée, et nous avons pensé qu'il nous serait possible de l'utiliser comme vaccin. Les expériences suivantes furent en effet concluantes.

Quatre taurillons inoculés avec 1 cent. cube d'une culture en bouillon de bœuf de dix-huit heures, ensemencée avec une goutte de sang de lapin conservé pendant seize mois en ampoule, résistent sans présenter d'autres troubles qu'une réaction locale passagère et, chez deux d'entre eux, une élévation thermique de 1° C. pendant vingt-quatre heures.

Quatre bufflons, inoculés avec la même dose d'une même culture, ne présentent aucune réaction, ni locale, ni générale.

Tous ces animaux sont éprouvés après des temps variant de treize à vingt-cinq jours par l'inoculation d'une dose de culture virulente représentant 100 doses sûrement mortelles. Aucun de ces animaux ne présente la plus légère réaction. Les témoins, deux taurillons et un bufflon, meurent dans les vingt-quatre heures suivant l'injection.

Faisons remarquer en passant qu'une immunité solide est acquise, dans les conditions de l'expérience, à la suite d'une unique inoculation; l'immunité étant assurée même si cette inoculation ne provoque aucune réaction apparente.

Quelle fut la cause de l'atténuation de la souche Italie? Sans doute les nombreux passages par lapins, car une souche indochinoise, tuant le taurillon à la dose de 1/5.000 de cent. cube, ne tua plus à la dose de 1/50 après huit passages par lapins, et cette dose, supportée sans réactions, conféra l'immunité.

Dans la pratique courante des vaccinations, l'emploi de cultures récentes présenterait de grandes difficultés; aussi, avant de préconiser ce mode de vaccination, nous avons d'abord voulu vérifier l'action de cultures conservées en ampoules pendant un certain temps. A cet effet, ce qui restait de la culture ayant servi à la vaccination des quatre bufflons dont nous avons parlé ci-dessus, fut réparti en ampoules qui furent scellées. Seize jours plus tard, un taurillon reçoit le contenu d'une ampoule, soit 1 cent. cube; il succombe quarante-quatre heures après l'inoculation. Un second taurillon reçoit 1/2 cent. cube, il succombe trente-neuf heures après.

Il résulte de ces expériences que l'injection d'une culture récente, en bouillon de bœuf, de la bactérie atténuée ne pro-

voque aucune réaction et vaccine, tandis que l'injection d'une dose égale de la même culture provoque une maladie mortelle si on la laisse vieillir. Nous avons fait varier les conditions de l'expérience, le résultat reste le même.

Nous prenons la culture en bouillon conservée pendant seize mois en ampoules (B). Un tube de bouillon de bœuf est ensemencé avec une goutte du contenu de l'une de ces ampoules. Un taurillon reçoit une injection sous-cutanée de 1/2 cent. cube de cette sous-culture après dix-huit heures d'étuve : il succombe vingt-trois heures après l'inoculation.

Un tube de bouillon de bœuf est ensemencé avec une goutte du sang du cœur d'un lapin mort seize heures après l'inoculation d'une trace de la culture conservée depuis seize mois. Un taurillon reçoit 1/2 cent. cube de cette dernière culture après dix-huit heures d'incubation : il succombe trente-six heures après.

Nous basant sur le fait que la bactérie atténuée reste telle si on la conserve en sang de lapin, nous avons voulu vérifier si la nature du milieu de culture n'exerçait pas une influence sur le résultat de l'inoculation.

I. — Un lapin est inoculé avec une trace du sang de lapin conservé en ampoule depuis seize mois (A). Il succombe seize heures plus tard. Avec le sang du cœur nous ensemençons, à raison d'une goutte par tube :

1° Un tube de macération préparée avec de la viande de bœuf;

2° Un tube de macération préparée avec de la chair de lapin. Après soixante heures d'incubation à 37°, nous inoculons :

a) Un taurillon avec 1/2 cent. cube de la culture en milieu bœuf: l'animal succombe quatre-vingt-quatre heures plus tard;

b) Un taurillon avec la même quantité de la culture en milieu lapin : il ne présente aucune réaction. Eprouvé onze jours plus tard, il résiste, sans réactions, à l'inoculation de 100 doses mortelles de culture virulente. Un témoin, qui reçoit la même dose, meurt en vingt-six heures.

II. — Comme contrôle, nous effectuons six passages par lapins de la souche Italie conservée en ampoules depuis seize mois (B), qui, nous l'avons vu plus haut, donne par inoculation un barbone mortel. Avec le sang du sixième lapin nous ensemençons un tube de macération de viande de bœuf et un tube de macération de chair de lapin. Après quinze jours d'étuve à 37°, nous inoculons :

a) Un taurillon avec 1/2 cent. cube de la culture en milieu bœuf : il succombe trente heures après l'inoculation;

b) Un taurillon avec 1/2 cent. cube de la culture en milieu lapin : il résiste sans présenter la plus légère réaction. Eprouvé quinze jours plus tard, il résiste, sans réactions, à une dose de culture virulente tuant un témoin en dix-neuf heures.

L'injection au taurillon d'une culture en bouillon de bœuf de la bactérie atténuée provoque donc le barbone expéri-

mental, toujours mortel, pour peu que cette culture soit âgée ; l'injection est au contraire inoffensive et immunisante si la bactérie atténuée est cultivée en milieu lapin, et cela même si la culture est âgée.

Les cultures de la bactérie atténuée du barbone destinées aux vaccinations doivent être faites en macération de viande de lapin.

Nous nous proposons de poursuivre l'étude de cette question de manière à déterminer la cause de la différence d'action des cultures suivant la nature du milieu de culture.

(Institut Pasteur de Saïgon.)

DE LA PATHOGÉNIE DU CHOLERA

(CINQUIÈME MÉMOIRE)

LE " CHOLÉRA INTESTINAL " DES JEUNES ANIMAUX

par le Professeur G. SANARELLI,
Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

I

La flore intestinale des jeunes lapins.

Les connaissances que nous venons d'acquérir sur la manière de se comporter des vibrions cholériques dans l'organisme animal montrent que ces microbes ne peuvent développer leur action pathogène sur l'intestin qu'en l'atteignant par la circulation du sang, pour ainsi dire « à revers ». Les expériences consignées dans nos précédents mémoires, ainsi que les innombrables tentatives de transmission du choléra aux animaux adultes, effectuées par beaucoup des auteurs qui nous ont précédés, ayant recours aux artifices les plus variés, nous ont amené à cette conclusion.

Pendant longtemps, on crut que l'acidité de l'estomac était le principal obstacle à la réussite de ces essais. Les multiples tentatives d'infection directe de l'intestin ne donnèrent pourtant pas de meilleurs résultats. Il s'ensuivit la croyance que l'appareil digestif des animaux de laboratoire n'était pas un milieu favorable pour les microbes du choléra. La poursuite de ces essais sur l'homme s'imposa ainsi, sans parvenir cependant à résoudre la question, par l'inconstance des résultats obtenus.

Les expériences elles-mêmes de Metchnikoff, qui reproduisit chez l'homme quelques cas probants de choléra asiatique, ne permirent guère d'éclaircir d'une façon satisfaisante l'obscure pathogénie de cette maladie, par les doutes et les controverses qu'elles ont soulevés.

On a vu, en effet, que l'homme est atteint bien rarement de choléra, même après l'ingestion de très grandes quantités de vibrions cholériques des souches les plus virulentes, alors même que l'acidité de son estomac ait été préalablement neutralisée et que le sujet se soit exposé, exprès, aux influences prédisposantes les plus variées, à partir des excès diététiques.

D'autre part, on a observé que les vibrions ingérés par l'homme, même si l'acidité de l'estomac n'a pas été neutralisée, peuvent apparaître dans son tube digestif et se retrouver dans ses fèces. Les porteurs en bonne santé ou précoces de vibrions, pendant les épidémies de choléra, confirment cette observation.

On n'arrive pas non plus à comprendre le pourquoi de la bénignité de tous ces différents cas de choléra expérimental chez l'homme, ni pourquoi la diarrhée, qui dans certains cas est si précoce, apparaît dans d'autres cas trente-six heures et jusqu'à cinq jours après l'infection expérimentale.

En somme, la manière de se comporter et d'agir du vibrion cholérique demeure très peu claire, même quand il est introduit dans l'organisme humain par la voie retenue jusqu'ici comme la seule voie naturelle, à savoir celle qui conduit directement à l'estomac.

C'est indiscutable, a écrit Metchnikoff (1), que le microbe du choléra est modifié dans les organes digérants, de telle façon que son effet est rendu inconstant et imprévu.

Comme on sait, cette influence est, selon notre éminent et regretté maître, le fait d'une flore intestinale particulière, parfois antagoniste, parfois favorisante.

Les recherches si suggestives qu'il a accomplies pour démontrer l'existence d'espèces microbiennes qui contrarient ou favorisent le développement du vibrion cholérique demeureront classiques.

Et ce fut précisément en suivant cette voie que Metchnikoff trouva, à la fin, chez les lapins nouveau-nés et envisagés de la sorte comme non encore envahis par une flore microbienne intestinale permanente ou abondante, les seuls animaux vraiment réceptifs pour l'infection cholérique provoquée par la voie buccale.

(1) Recherches sur le choléra et les vibrions (IVe mémoire). Ces *Annales*, 1894, p. 546.

En effet, on sait que les petits-lapins nouveau-nés contractent le choléra intestinal avec une extrême facilité, soit en introduisant directement dans leur bouche les vibrions ou soit en les répandant sur les mamelles de la lapine. Le tableau anatomique, les lésions histologiques, ainsi que l'examen bactériologique, que ces petits animaux présentent à la suite de pareille infection expérimentale, décrite magistralement par Metchnikoff, ont les plus grandes analogies avec ce qui se passe dans le processus du choléra humain.

Néanmoins, l'analogie des symptômes manque. Les animaux meurent en se refroidissant lentement, sans vomissement, sans crampes et sans albuminurie; ils ne présentent qu'une mollesse générale accompagnée de diarrhée. Au fond, ils meurent d'entérite aiguë à caractères assez banaux.

Cette sensibilité des lapins nouveau-nés, à l'égard des vibrions cholériques, ne dure pas beaucoup de jours. A partir du dixième jour après la naissance, les petits lapins commencent à supporter l'administration buccale des cultures cholériques virulentes, sans présenter aucun symptôme de maladie. Ils sont désormais réfractaires au choléra intestinal.

Je me suis proposé d'étudier de plus près les véritables raisons de l'établissement si soudain d'une telle solide immunité naturelle contre le choléra.

Le phénomène est d'autant plus intéressant qu'il se reproduit indifféremment, avec une uniforme régularité, sur n'importe quel petit lapin au delà d'un certain nombre de jours.

Je pensai que si l'immunité naturelle acquise dans une si étroite limite de jours par ces jeunes animaux reposait effectivement sur une flore bactérienne intestinale antagoniste, survenue dans ce court laps de temps, il ne devrait pas être impossible d'identifier successivement les différentes espèces qui la constitueraient, au fur et à mesure de leur apparition dans l'intestin des lapins venant de naître. Il s'agissait de suivre méthodiquement l'établissement graduel de cette flore, dès les premières heures de vie, jusqu'au dixième ou douzième jour.

On sait que la gestation des lapines est de très courte durée, de trente jours seulement; leur progéniture est ainsi très délicate; pendant une dizaine de jours ces petits êtres ne se

nourrissent que de lait; ils commencent ensuite à avaler quelques brins d'herbe.

Étrange coïncidence : c'est à partir de ce moment que les petits lapins se montrent résistants à l'infection cholérique par la voie buccale. En recherchant méthodiquement quelle est la flore microbienne du tube digestif des lapins, dès leurs premiers jours de vie, je suis arrivé à établir les données suivantes :

a) Chez les lapins à la mamelle, l'examen direct microscopique, aussi bien que les ensemencements, démontrent que le contenu stomacal est constamment dépourvu d'espèces microbiennes à l'état végétatif, nonobstant que beaucoup d'espèces asporogènes se trouvent présentes dans leur cavité bucco-pharyngienne dès les premières heures après leur naissance. Ces espèces sont généralement représentées par des microcoques, des streptocoques et des sarcines. On a une confirmation indirecte de l'action délétère exercée par la réaction du contenu stomacal sur les microbes asporogènes provenant de la cavité buccale, dans la constante stérilité du duodénum et de la portion contiguë supérieure du jéjunum.

b) Chez les jeunes lapins, les germes intestinaux apparaissent pour la première fois dès même que s'achèvent les premières quarante-huit heures de vie. Leur présence s'accuse tout d'abord dans le contenu du cæcum qui, entre le troisième et le quatrième jour, pullule d'une flore microbienne très variée. Tous ces microbes, sporogènes ou non, appartiennent à des espèces anaérobies.

c) Chez les lapins nouveau-nés, l'intestin grêle est généralement dépourvu de microbes. Par exception on peut y isoler quelques rares sporogènes, appartenant à des espèces banales, échappées, à l'état de spore, à l'action du contenu gastrique. Eventuellement, dans le trajet inférieur du jéjunum, on rencontre quelques anaérobies, remontés vraisemblablement du cæcum.

d) Les premiers germes aérobies, qui s'établissent dans l'intestin des lapins à la mamelle, appartiennent à la grande famille ubiquitaire des B. coli. Ceux-ci y apparaissent dès le dixième jour de vie, mais leur nombre, même dans l'intestin des lapins plus âgés, demeure toujours exigu et presque négli-

geable à l'égard de la quantité incalculable des germes anaérobies qui s'accumulent particulièrement dans le contenu cæcal.

e) Tous ces microbes intestinaux, aérobies et anaérobies, sont d'origine fécale et viennent vraisemblablement transmis, en grande partie, aux nouveau-nés, par les mamelles maternelles salies par les excréments.

II

Préliminaires sur « le processus cholérique » de l'intestin chez les jeunes lapins.

Nous venons de voir comment s'établit la flore microbienne normale dans le tube digestif des lapins qui viennent de naître. Donnons, à présent, un regard sur la manière de se comporter des vibrions cholériques administrés par la bouche sur ces jeunes animaux.

Sur le tableau général de la maladie, il reste très peu à ajouter à tout ce que Metchnikoff a exposé avec tant de précision, dans ses belles recherches exécutées avec le vibrion de Massaoua.

Le tableau anatomique et bactériologique décrit par Metchnikoff peut se résumer brièvement ainsi : les petits lapins de un à quatre jours, infectés par la bouche avec de seuls vibrions, meurent en général, dans la moitié des cas, entre le sixième et le huitième jour; les petits lapins de quatre à huit jours, infectés avec des vibrions mélangés à d'autres microbes favorisants, succombent en un laps de temps très variable : entre trente-six heures et neuf jours. Les principales lésions anatomiques, à l'autopsie, consistent en général en une entérite aiguë avec desquamation et une forte distension du côlon et du cæcum, qui restent remplis d'une sérosité très liquide, riche en détritus et flocons de mucus. Selon Metchnikoff, l'intestin grêle serait le siège principal du développement des vibrions; mais le cæcum aussi renfermerait de ces microbes en grande quantité. En dehors de l'intestin, les vibrions se trouvent, le plus souvent, dans la vésicule biliaire et, aussi, dans un quart des cas, dans le sang.

En se basant sur ces constatations, Metchnikoff crut pouvoir tirer la conclusion suivante : « Les vibrions ingérés passent à travers l'estomac (dont la réaction est toujours acide) et s'établissent dans l'intestin grêle et le cæcum, où, pour ainsi dire, ils attendent quelque condition favorable pour manifester leur action pathogène (1). »

Une fois produite cette « condition favorable » attendue, les vibrions se multiplieraient abondamment le long de tout l'intestin; à ce moment : « la toxine cholérique, élaborée dans l'intestin, altère la muqueuse et provoque la desquamation de l'épithélium. Il y a donc lieu de considérer le processus du choléra intestinal des jeunes lapins comme une intoxication par des vibrions développés dans le contenu des intestins (2) ».

Les résultats de mes recherches, visant 116 protocoles d'expériences sur de jeunes lapins, sont en général d'accord avec les constatations de Metchnikoff, mais, dans quelques points, ils m'ont fait sentir la nécessité de vérifications plus précises et plus complètes.

Particulièrement en ce qui concerne le procédé qui permet d'obtenir le choléra intestinal chez les jeunes lapins, j'ai trouvé que, avec le vibrion de l'Isonzo, il n'est pas nécessaire de renforcer l'action des vibrions en les associant à des microbes favorisants. Parfois on peut rencontrer une portée de lapins qui résiste fortement à l'infection transmise par la bouche; il s'agit de cas très rares de résistance naturelle tenant peut-être à la race des lapins, mais bien négligeables dans des expériences exécutées sur une large échelle. En effet, ce cas ne s'est présenté qu'une seule fois au cours de mes recherches, chez huit petits lapins, appartenant à une seule portée, auxquels il fut absolument impossible de donner le choléra par la bouche.

Comme règle générale, on peut affirmer que, jusqu'à l'âge de huit à onze jours, tous les lapins sont indistinctement susceptibles de contracter le choléra par la voie buccale, sans besoin d'aucun adjuvant.

Chez les jeunes lapins de deux à cinq jours, la mort se produit habituellement au bout de trois à six jours. Lorsque les

(1) *Loc. cit.* (IVe mémoire), p. 558 et 564.
(2) *Ibidem.*, p. 565.

lapins sont un peu plus âgés, la mort arrive plus lentement, mais dans ce cas, les lésions intestinales sont plus graves et même le tableau bactériologique est plus net et plus caractéristique.

J'ai observé le cas d'un petit lapin de 100 grammes, infecté à l'âge de quatre jours et mort dix jours après, en présentant le tableau anatomique et bactériologique vraiment identique à celui du choléra humain, à savoir : stérilité du sang, des organes (foie, rate, reins, etc.) et du duodénum; quantité innombrable de vibrions le long de tout le reste du tube digestif, surtout dans le côlon, dans le cæcum et dans l'appendice.

Lorsque les jeunes lapins ont dépassé dix jours d'âge, ils résistent à n'importe quelle contagion par la voie buccale réalisée, bien entendu, avec une quantité non exagérée de vibrions, même si ces derniers étaient accompagnés de microbes favorisants. J'employais, dans ce but, des cultures de colibacilles, de protéus et de pyocyanique.

Toutefois, en persistant pendant quelques jours de suite à administrer même des vibrions seuls, mais à doses élevées (une culture par jour), les lapins de douze à quinze jours, ayant atteint de 120 à 130 grammes de poids, peuvent succomber; dans ce cas, on ne constate plus le tableau bactériologique habituel du choléra. Les animaux meurent à la suite d'une gastro-entérite toxique avec des vibrions plus ou moins abondants, surtout dans les dernières portions du tube digestif (iléum et cæcum); mais les parois intestinales ne présentent plus le tableau anatomique et le transsudat aqueux si caractéristique du choléra intestinal des jeunes lapins.

Ensuite, lorsque les lapins ont gagné le poids de 150 grammes, ils résistent au choléra intestinal par voie buccale de la façon la plus absolue. Néanmoins, si on continue à leur administrer, pendant plusieurs jours de suite, des vibrions mêlés à d'autres germes (colibacilles, protéus et pyocyanique), ils finissent encore par succomber après quatorze à quinze jours, par gastro-entérite toxique. Leur tube digestif, cependant, ne présente à l'autopsie qu'un tableau bactériologique banal : point de vibrions, de protéus et de pyocyaniques.

Dans la suite, nous reviendrons sur la signification de tout cela. Je me bornerai, pour le moment, ne pouvant entrer

dans les détails de mes cahiers d'expériences, à signaler seulement les points les plus saillants de mes observations que je considère comme essentielles pour la démonstration et la documentation de la donnée fondamentale qui se dégage de l'ensemble de mes recherches sur ce sujet.

Cette donnée, que je considère comme très importante, est la suivante. Chez les jeunes lapins non seulement les vibrions, mais aucun autre microbe dépourvu de spores (comme le colibacille, le protéus, le pyocyanique, etc.), ne sont capables de traverser vivants la barrière du contenu gastrique.

Lorsque ces microbes, entrés par la voie buccale, réussissent à atteindre les différentes portions du tube digestif, ils ne poursuivent pas le chemin qui pourrait sembler le plus direct et naturel, celui qui passe par l'estomac. Au contraire, ils prennent un chemin indirect, à travers les voies de la lymphe et du sang, de la circulation générale.

Dans les chapitres suivants, se trouve la démonstration expérimentale de cette conclusion.

III

Les vibrions et la muqueuse bucco-pharingienne des jeunes lapins.

Voyons avant ce qui arrive des vibrions mis en contact de la muqueuse buccale des petits lapins à la mamelle.

Nous avons dit plus haut, que la flore buccale des lapins à la mamelle, cultivable dans les milieux ordinaires, est généralement constituée par des coccus communs pyogènes, des streptocoques et des sarcines. Mais la flore visible au microscope et non cultivable est sans doute plus variée. De plus, si on ne perd pas de vue les ensemencements de la bouche, on remarque presque toujours que, quelques jours après, apparaissent sur les tubes de gélose d'autres espèces microbiennes à développement plus lent : microbes chromogènes, moisissures, streptotricées variées, etc.

On comprendra combien il est compliqué d'étudier les vicissitudes d'une espèce microbienne déposée sur la muqueuse de

la bouche d'un ou de plusieurs petits lapins appartenant à une même portée. Les inévitables contaminations réciproques par l'entremise des mamelles de la mère, rendent les résultats assez confus et incertains. Pour éviter de tels inconvénients, il faut adopter certaines règles, par exemple : ne tenir compte que des infections buccales qui se produisent simultanément chez tous les sujets d'une même portée, ou encore de suivre seulement le sort des vibrions que l'on a administrés sur un seul petit lapin choisi dans chaque portée.

En tout cas, les données consignées dans les protocoles de vingt et une expériences, où je tins compte ainsi de cet objectif, sont assez précises et concordantes entre elles pour me permettre d'affirmer ce que je vais exposer.

Malgré l'extrême sensibilité des lapins à la mamelle à l'action pathogène des vibrions cholériques, ces derniers ne s'arrêtent pas longtemps, et ne s'adaptent pas à vivre, comme tant d'autres germes banaux, sur la muqueuse bucco-pharyngienne de ces petits animaux.

Si l'on examine, dans des préparations colorées, les frottis de la cavité buccale d'un de ces petits lapins qui a reçu quelques heures avant une abondante quantité de vibrions (même 1/2 culture sur gélose), on voit que ces derniers sont encore très nombreux au milieu des autres espèces de la flore ordinaire de la bouche. Mais aussitôt que six heures se sont écoulées, si l'on pratique un nouveau frottis et qu'on l'ensemence, les résultats sont bien différents. Dans les préparations colorées, on ne parvient plus à retrouver de vibrions, les ensemencements seulement y accusent leur présence, mais qui va en diminuant, depuis huit heures jusqu'à quarante-huit heures après.

Sans nul doute, les vibrions ne se multiplient pas sur la muqueuse buccale des petits lapins; ils tendent à y disparaître progressivement. Si les petits lapins, en effet, ne meurent pas avant, la disparition complète et définitive des vibrions de leur bouche, reconnue par le résultat négatif des ensemencements, se vérifie entre le septième et le huitième jour. Si, au contraire, les animaux meurent plus tôt, les ensemencements de la cavité buccale en décèlent presque toujours la présence, quel que soit le nombre de jours écoulés depuis le début de

l'infection. On remarque en outre que : si la mort survient, comme il arrive parfois, très précocement, deux jours après, par exemple, la quantité de vibrions qui se cultivent de la muqueuse est encore assez faible. A mesure, cependant, que la maladie se prolonge, la quantité des colonies donnée par les ensemencements de la muqueuse buccale faites à l'autopsie augmente progressivement. Ainsi, lorsque la mort des petits lapins se produit entre cinq, sept et huit jours, elles sont innombrables sur les tubes de gélose.

Il était nécessaire de rechercher la raison de ce fait, particulièrement de la rapide disparition des vibrions de la muqueuse buccale, qui se remarque au début.

Elle semblerait tenir principalement à l'action légèrement vibrionicide du lait maternel. Il ne m'a pas été possible, malgré tous les artifices employés, d'essayer directement le pouvoir vibrionicide du lait de lapine. Mais comme ce même phénomène de la rapide disparition des vibrions de la cavité buccale s'observe chez les chiens nouveau-nés — sur lesquels j'ai pratiqué aussi des expériences — j'ai examiné à cet égard le lait de chienne.

J'ai pu obtenir, par pression, quelques centimètres cubes de lait d'une chienne, qui venait de mettre bas, après avoir convenablement nettoyé et désinfecté la mamelle au moyen d'alcool, chloroforme et éther.

Une première fois, la réaction du lait était légèrement alcaline; une seconde fois, elle était neutre.

Dans un premier essai, j'ai fait tomber de petites quantités de vibrions (1), dans 1 centimètre cube de lait; les prélèvements successifs avec l'anse de platine ont donné les résultats suivants : très rapide et progressive disparition des vibrions. Après quatre à six heures, l'anse de platine immergée dans cet échantillon de lait ne ramena plus de vibrions vivants et les cultures restèrent négatives. Mais dans la suite, en maintenant toujours le lait à l'étuve à 37°, les vibrions réapparaissent et le lendemain ils se cultivent en grande quantité.

(1) Une anse normale d'une suspension de 10 cent. cubes de solution physiologique, renfermant 1/10 de culture de vibrions de vingt-quatre heures sur gélose inclinée.

Une autre expérience, exécutée par mon aide, M. Sampietro, a donné les résultats suivants :

Ensemencement par frottis sur gélose		aussitôt après. .	150
—	—	1 heure après. .	80
—	—	2 heures après .	25
—	—	3 —	1

Dans les prélèvements opérés à partir de la quatrième heure, les vibrions réapparaissent en grand nombre. Ils disparurent bientôt à nouveau, sans doute à cause de la contamination d'un coccus survenue dans le lait, en rendant legèrement acide la réaction.

En somme ces constatations confirment ce que l'on savait déjà sur l'action bactéricide du lait frais. Cette action est certainement légère et de courte durée, mais comme il s'agit des vibrions, dont l'extrême fragilité est connue, et de lait qui se renouvelle à chaque tétée, elle ne peut manquer d'avoir son effet, d'autant plus qu'à cette action humorale du lait s'ajoute le balayage mécanique de la muqueuse buccale par le lait qui s'écoule et les mouvements de déglutition.

Il reste à expliquer le pourquoi de l'abondante réapparition des vibrions dans la cavité bucco-pharyngienne des petits lapins qui meurent quelques jours après de choléra.

Cette réapparition se rattache à deux causes. La première est créée par les conditions mêmes du petit lapin malade. Quelque temps avant de mourir, peut-être même par manque de force, il cesse de téter. Il n'éprouve plus, alors, le bénéfice de l'action vibrionicide du lait combiné à celui de la détersion mécanique provoquée par la tétée, et les quelques vibrions survivants se développent à leur aise sur la muqueuse bucco-pharyngienne du petit lapin mourant.

La seconde cause consiste dans l'excrétion buccale des vibrions. Nous avons déjà insisté, dans le troisième chapitre de notre quatrième mémoire, sur l'excrétion buccale des vibrions chez les cobayes qui meurent après l'injection péritonéale de vibrions cholériques. Nous verrons, dans un travail qui suivra, qu'aussi chez les lapins adultes qui meurent de choléra transmis par voie parentérale, l'excrétion buccale des vibrions représente un fait constant.

La même chose se vérifie chez les petits lapins à la mamelle, inoculés avec des vibrions par voie parentérale, ainsi que le montrent les expériences exécutées sur deux portées composées, l'une de quatre petits lapins et l'autre de deux. Les deux tableaux suivants les résument :

Portée I (4 petits lapins, nés le 22 juillet 1917).

PETITS LAPINS	AGE jours	POIDS gr.	VOIE D'INOCULATION	DOSE de culture sur GÉLOSE	MORT après	Nombre de colonies — ENSEMENCEMENTS du SANG	du PÉRITOINE	de la BOUCHE
1	4	95	Endoveineuse.	1 anse.	16 h.	∞	++	0
2	4	75	Sous-cutanée.	Id.	24 h.	+++	∞	0
3	4	115	Id.	Id.	24 h.	25	∞	20
4	6	80	Péritonéale.	Id.	4 h.	0	0	∞

Portée II (2 petits lapins, nés le 25 juillet 1917).

PETITS LAPINS	AGE jours	POIDS gr.	VOIE D'INOCULATION	DOSE de culture dans l'EAU PEPTONÉE	MORT après	Nombre de colonies — ENSEMENCEMENTS du SANG	du PÉRITOINE	de la BOUCHE
1	3	65	Sous-cutanée.	1/10 c.c.	9	0	50	+++
2	3	90	Id.	1/4 c.c.	3	0	0	+++

Un simple coup d'œil donné à ces deux tableaux montre que l'excrétion buccale des vibrions n'est nullement influencée par la quantité des microbes injectés et n'a pas le moindre rapport avec la quantité des vibrions présents dans le sang. Elle dépend plutôt de la durée de la maladie. Dans les cas d'infection aiguë générale, à type septicémique, la bouche ne renferme que peu ou pas de vibrions. Lorsque la mort tarde à se

produire, ceux-ci, au contraire, y sont très nombreux, bien qu'à ce moment ils aient déjà disparu du sang et des cavité séreuses.

Le cas du quatrième lapin du premier tableau appelle particulièrement l'attention. Quatre jours après l'injection péritonéale, les vibrions avaient disparu aussi bien du péritoine que de la circulation, alors qu'ils étaient en train de s'éliminer en masse par la muqueuse bucco-pharyngienne.

Il se produit donc, même chez les petits lapins injectés par voie parentérale, le même fait que celui observé chez les cobayes, à savoir : une abondante excrétion buccale de vibrions dans les cas à lente évolution.

Chez ces petits lapins, injectés sous la peau ou dans le péritoine, il n'y avait pas lieu de soupçonner même la plus lointaine possibilité d'une contamination accidentelle. Il faut tenir présent, en outre, que le contenu gastrique de tous les lapins, nouveau-nés ou adultes, contrairement à ce qui se constate chez les cobayes, accuse toujours une réaction très acide. On ne peut donc penser à une contamination de l'arrière-bouche par renvoi.

Enfin, l'abondante quantité de vibrions rencontrés dans la cavité buccale ne permet pas non plus de penser qu'il s'agisse d'une contamination indirecte provenant du côté des excréments.

Ces considérations, ainsi que celles déjà faites à propos de l'excrétion buccale des vibrions chez les cobayes, conduisent à envisager ce phénomène comme certainement acquis.

En conclusion, les vicissitudes des vibrions cholériques introduits dans la bouche des petits lapins à la mamelle sont les suivantes : en un premier temps, les vibrions tendent à disparaître rapidement, étant en partie engloutis, étant en partie tués par l'action bactéricide du lait maternel; en un second temps, surtout si le cours de la maladie est long, les vibrions réapparaissent en grand nombre comme chez les cobayes injectés dans le péritoine.

Chez les lapins à la mamelle se vérifie donc également l'excrétion buccale des vibrions cholériques.

IV

Chez les lapins nouveau-nés les vibrions ne peuvent pas traverser vivants la barrière gastrique.

Bien que R. Koch, dès sa première conférence sur le choléra, ait mis en relief la très faible résistance des vibrions à l'égard des milieux acides, il envisagea comme possible leur passage à l'état vivant à travers l'estomac, grâce à la protection de substances alimentaires incomplètement attaquées par l'acidité gastrique.

Cette croyance, basée sur quelques circonstances très vraisemblables rapportées de certains épisodes épidémiologiques, a été admise jusqu'ici et n'a jamais été contestée par personne.

Toutefois, l'observation clinique la plus attentive a montré, dans toutes les épidémies, que des sujets en excellentes conditions de santé et avec l'estomac en parfait état de fonction, peuvent être atteints de choléra, ce qui est en ouverte contradiction avec le dogme du barrage infranchissable constitué par l'acidité du suc gastrique. On a été ainsi amené à imaginer l'existence de formes permanentes du vibrion cholérique, encore ignorées, lui permettant d'échapper à l'action mortelle de l'acide gastrique. Encore aujourd'hui, selon l'opinion la plus répandue, l'activité antibactérienne du suc gastrique est rattachée principalement au degré d'acide chlorhydrique que titre son contenu.

Cependant les recherches expérimentales exécutées d'après ces directives, par beaucoup d'auteurs, ont conduit, comme il arrive assez souvent, à des conclusions très discordantes. Quelques-uns attribuent au vibrion cholérique une résistance au suc gastrique vraiment formidable : deux heures selon Straus et Wurtz (1). D'autres la réduisent considérablement : entre quarante à soixante minutes, selon Stern (2); à une demi-heure

(1) De l'action du suc gastrique sur quelques microbes pathogènes. *Arch. de méd. expérim. et d'Anat. path.*, 1889, n° 3.

(2) Ueber das Verhalten der Choleravibrionen dem menschlichen Mageninhalt gegenüber. *Centr. f. Bakt. Orig.*, **47**, p. 666.

seulement selon Kurlow et Wagner (1) et selon Cappelletti (2).

J'ai pensé qu'il était oiseux de s'arrêter davantage sur cette voie si controversée et incertaine de l'étude *in vitro* de l'action du suc gastrique prélevé de l'estomac de l'homme, à l'aide d'une sonde, après des repas d'épreuve.

Les petits lapins nouveau-nés qui prennent l'infection intestinale par contamination buccale tout en conservant un contenu gastrique fortement acide, offre le meilleur matériel vivant d'étude pour trancher une aussi importante controverse biologique.

Je dirai, tout de suite, que dans plus d'une centaine d'autopsies de lapins à la mamelle morts d'infection cholérique, provoquée non seulement par la voie buccale que par d'autres voies, les ensemencements du contenu gastrique n'ont jamais donné une seule culture de vibrions, même en ensemençant d'abondantes quantités de contenu gastrique et en me servant de milieux liquides de culture avec excès de carbonate de chaux, dans le but de neutraliser l'acidité du lait caillé.

Dans ses recherches sur le choléra intestinal des jeunes lapins, Metchnikoff a mentionné deux fois (3) la très rare présence des vibrions dans l'estomac « de réaction toujours acide ». Mais il ne précise pas dans quelle condition il l'avait constatée : dans un simple examen microscopique, comme je suis enclin à penser, ou à la suite de l'ensemencement du contenu gastrique.

En effet, non seulement mes ensemencements de ce contenu opérés dans les meilleures conditions de réussite sont restés toujours stériles, mais encore l'examen direct au microscope du lait caillé qui remplit l'estomac des petits lapins ne m'a jamais révélé la présence de forme vibrionienne.

Néanmoins, si on examine le contenu gastrique de ces petits lapins, morts ou sacrifiés pas plus tard que vingt-quatre heures après l'administration par la bouche des vibrions, on en

(1) Ueber die Wirkung des menschlichen Magensaftes auf pathogene Mikroorganismen. *Wratsch*, 1889, p. 926.

(2) Contributo allo studio dell'azione del succo gastrico sul vibrione del colera. Ufficiale Sanitario. *Rivista d'Igiene e di Med. pratica*, 1897, anno X.

(3) *Loc. cit.* (IVe mémoire), p. 562 et 564.

TABLEAU I.

Analyse du contenu gastrique de 4 lapins à la mamelle (neufs).

		1	2	3	4
Age des lapins sacrifiés . . .	Jours .	2	4	6	8
Poids — . . .	Gr. . .	55	68	93	140
Poids du contenu gastrique.	Gr. . .	5	5,3	3,3	5,4
Acidité totale en $\frac{KOH}{10}$. . . .	C.c. 0/0	106	217	228	176
Chlore total	Gr. . .	0,193	0,096	0,136	0,237
Acide chlorhydrique libre . .	Gr. . .	0,04	0,03	0,06	0,03
Acidité totale calculée en acide lactique	Prop. .	1 : 105	1 : 51	1 : 49	1 : 63
Acide lactique	—	1 : 1.111	1 : 983	1 : 1.857	1 : 1.300
Acide chlorhydrique.	—	1 : 2.500	1 : 3.333	1 : 1.666	1 : 333

TABLEAU II.

Analyse du contenu gastrique de 7 lapins à la mamelle (morts de choléra intestinal).

	1	2	3	4	5	6	7
Age des lapins le jour de l'infection. Jours	2	2	2	2	2	2	4
Poids des lapins le jour de l'infection . . . . Gr.	95	85	70	65	70	95	105
Durée de la maladie. Jours	6	6	6	7	7	8	15
Poids des lapins le jour de la mort. Gr.	125	110	100	100	105	125	165
Poids du contenu gastrique à la mort Gr.	10	6,9	4,5	8,4	6,2	9,3	10,0
Acidité totale en $\frac{KOH}{10}$ c. c. 0/0	325	314	395	432	403	366	516
Chlore total libre. Gr.	0,253	0,267	0,243	0,150	0,178	0,227	0,250
Acide chlorhydrique libre. . . . . . Gr.	0,05	0,05	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04
Acidité totale calculée en acide lactique . .	1 : 34	1 : 36	1 : 39	1 : 26	1 : 29	1 : 30	1 : 22
Acide lactique. . . .	1 : 1.010	1 : 1.010	1 : 980	—	—	1 : 926	1 : 1.389
Acide chlorhydrique.	1 : 2.000	1 : 2.000	1 : 1.666	1 : 2.000	1 : 2.500	1 : 2.500	1 : 2.500

TABLEAU III.

Analyse du contenu gastrique de 3 lapins à la mamelle atteints de choléra intestinal (sacrifiés à différents moments).

	1 (1)	2	3
Age des lapins le jour de l'infection . . .	2 jours	2 jours	2 jours
Poids — — . . .	60 gr.	48 gr.	55 gr.
Sacrifiés après	12 heures	20 heures	2 jours
Poids du corps le jour de la mort	60 gr.	50 gr.	50 gr.
Poids du contenu gastrique analysé. . . .	3 gr. 8	6 gr.	5 gr.
Acidité totale en $\frac{KOH}{10}$ . . . . . c. c. 0/0	268,4	210	290
Acidité totale calculée en acide lactique. .	1 : 41	1 : 53	1 : 38

(1) Le 1er lapin était né de mère vaccinée.

observe parfois quelques-uns (dans les préparations convenablement dégraissées avec xylol et alcool-éther, etc.), soit des vibrions isolés ou réunis en petits groupes, tout à fait semblables aux vibrions qu'on a administrés. Mais, même en faisant abstraction du résultat négatif de leur ensemencement, la faiblesse de leur coloration, et l'aspect cocco-bacillaire que présente la plupart de ces vibrions trahissent leur mort. Au delà de vingt-quatre heures, après l'ingestion des vibrions, on ne parvient plus à déceler la présence du moindre vibrion. Tués par le milieu gastrique, ils sont bientôt digérés.

J'ai voulu approfondir davantage ce point et j'ai prié à cet effet mon aide, M. Scala, d'analyser le contenu gastrique d'un certain nombre de petits lapins sains et d'autres morts de choléra ou sacrifiés à différentes périodes de la maladie, c'est-à-dire après des laps de temps différents à partir du moment de l'administration des vibrions.

En examinant comparativement ces trois différents tableaux, on remarque en premier lieu que chez les petits lapins nouveau-nés, l'acidité totale moyenne du contenu gastrique, calculée en c. c. de potasse $\frac{N}{10}$, employée par chaque 10 cent. cubes de liquide gastrique est de 182, alors que chez les petits lapins

malades cette acidité atteint 392. L'acidité gastrique totale est donc plus élevée chez les petits lapins rendus cholériques que chez les petits lapins neufs.

Ce fait, en apparence surprenant, s'explique vraisemblablement en faisant intervenir une altération de la fonction gastrique provoquée par le processus morbide déclenché dans l'estomac, avec production d'acides organiques, ainsi que cela se vérifie souvent chez l'homme.

En effet, même en comparant entre elles les données des tableaux II et III, on remarque que, chez les petits lapins malades, l'acidité gastrique totale, au lieu de diminuer, augmente en général à mesure que l'infection se prolonge.

Dans le but d'éprouver directement l'action du contenu gastrique des petits lapins neufs sur le vibrion du choléra, j'ai pratiqué deux séries d'expériences, la première *in vitro*, la seconde *in vivo*. Les expériences *in vitro* sont les plus compliquées, parce que l'estomac des petits lapins à la mamelle est toujours rempli par un magma compact, formé de lait caillé et ne renferme presque jamais de partie liquide que l'on puisse séparer. Seulement dans certains cas, en soumettant ce magma à une forte centrifugation, je suis parvenu à en retirer quelques centimètres cubes d'un liquide trouble, muqueux, filant, de réaction fortement acide, stérile.

Abandonné à lui-même, après la centrifugation, ce liquide se sépare en deux couches : le tiers supérieur est constitué par de la graisse, les deux tiers inférieurs par une sérosité plus fluide et transparente. Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 37°, cette sérosité demeure encore acide et stérile.

Les épreuves sur les vibrions ont été conduites selon le procédé usuel. Dans 1 cent. cube de cette sérosité on délaye une anse, même très abondante, de vibrions et l'on pratique ensuite les ensemencements habituels périodiques en eau peptonée et sur gélose.

Toutes les épreuves que j'ai faites ont donné toujours des résultats identiques : les vibrions meurent presque instantanément, aussitôt mis en contact avec cette sérosité gastrique.

Après cinq minutes, la stérilisation est complète. Souvent l'ensemencement reste stérile, en le pratiquant avec l'anse

même remplie de vibrions que l'on vient d'immerger dans la sérosité en examen.

Si l'on fait des préparations en goutte pendante, on constate que les vibrions deviennent immobiles et ne donnent plus signe de vie aussitôt qu'ils touchent le liquide gastrique.

J'ai, en outre, observé que pour démontrer cette action vibrionicide, on peut même se passer de centrifuger le lait caillé. Il suffit de déposer une anse de vibrions à la surface de ce magma de caséine caillée et d'y prélever ensuite des échantillons successifs. Dans ces essais, également, on constate la mort de tous les vibrions en cinq minutes au plus.

Cette puissante action vibrionicide du contenu gastrique n'est pas seulement le propre aux lapins à la mamelle. Le contenu gastrique des lapins adultes agit de même et cette activité se maintient aussi élevée, même pendant les états de dénutrition et d'émaciation avancée.

Voici, les analyses du liquide gastrique recueilli à l'autopsie de l'estomac de trois lapins morts après plusieurs jours de maladie, dans des conditions d'extrême dénutrition et presque de marasme :

TABLEAU IV.

Analyse du liquide gastrique de 3 lapins adultes morts après plusieurs jours de maladie.

		1 (nº 170)	3 (nº 177)	2 (nº 175)
Poids initial du lapin. . .	Kilogr.	1,690	1,620	1,860
Durée de la maladie . . .	Jours.	9	8	6
Poids après la mort. . . .	Kilogr.	1,000	1,350	1,320
Quantité du liquide gastrique analysé.	C. c. .	12	15	15
Poids spécifique à 15°. . .	. . . .	—	1,0234	1,0398
Acidité totale en $\frac{KOH}{10}$. . .	C c 0/0	94,0	90,0	87,7
Acidité totale en acide lactique	°/₀	0,846 (2 118)	0,810 (1 : 123)	0,790 (1 : 126)
Acide chlorhydrique libre.	—	0,268 (1 : 373)	0,090 (1 : 111)	0,270 (1 : 370)
Acide lactique.	—	0,288 (1 : 347)	0,700 (1 : 143)	0,500 (1 : 200)

Le liquide gastrique nº 1 de ce tableau a été recueilli à l'autopsie d'un lapin (nº 170) qui était mort neuf jours après

une injection endoveineuse de vibrions. Son poids avait baissé de 1 kilogr. 690 à 1 kilogramme ; l'estomac, aux parois très amincies, renfermait presque 12 cent. cubes de liquide aqueux, louche mais stérile.

Le liquide gastrique n° 2, du volume de 15 cent. cubes environ, provient de l'estomac d'un autre lapin (n° 177) mort à peu près dans les mêmes conditions d'extrême épuisement, huit jours après une injection endoveineuse de vibrions.

Même le liquide gastrique n° 3 a été recueilli de l'estomac d'un lapin (n° 175) mort après sept jours de maladie.

Tous ces liquides, parfaitement stériles, soumis à la centrifugation et essayés ensuite sur des vibrions cholériques, les tuaient en moins de cinq minutes.

Autrement plus intéressante a été une autre épreuve pratiquée avec du liquide gastrique retiré d'un petit lapin de vingt-sept jours, qui pendant quinze jours consécutifs avait englouti journellement en entier les cultures suivantes sur gélose : 2 cultures de vibrions ; 1 de B. coli ; 1 de protéus et 2 de pyocyanique. Malgré ces nombreuses administrations massives, le poids du petit lapin avait augmenté progressivement de 170 grammes à 240 grammes. Seulement, à la veille de la mort, il était retombé à 210 grammes. La mort s'était produite à la suite d'une entérite toxique. L'estomac, quelque peu réduit de volume, renfermait des détritus végétaux et beaucoup de liquide à réaction fortement acide. Centrifugé et essayé sur vibrion, B. coli, pyocyanique et protéus, il donna les résultats suivants : les vibrions et le pyocyanique succombèrent après un contact d'une minute seulement, le protéus après cinq minutes, le B. coli après dix minutes.

Il ne peut donc y avoir de doute sur l'efficacité réelle de barrage que la cavité gastrique des lapins, jeunes et adultes, oppose au passage des vibrions introduits par bouche.

Pour compléter cette recherche dans une autre série d'expériences, j'ai introduit directement les vibrions dans l'estomac des petits lapins à la mamelle. En pratiquant une petite incision dans la mince épaisseur de la paroi abdominale, au niveau de la grande courbure de l'estomac, cet organe apparaît tout de suite, chez les petits lapins, avec sa convexité, bombée et régulière, adhérente à la lèvre même de la blessure.

A l'aide d'une très petite aiguille et d'une petite seringue on peut pénétrer, alors, dans l'estomac et y injecter quelques gouttes d'une épaisse émulsion de vibrions.

L'acte opératoire est délicat, mais absolument inoffensif et, ce qui importe surtout dans notre cas, tout à fait dépourvu de conséquences. En effet, les petits lapins supportent parfaitement ces injections endogastriques de vibrions. Ils continuent à vivre et à gagner du poids régulièrement, comme les autres petits lapins témoins de la même portée.

Ce résultat confirme, ainsi, d'une façon irréfutable qu'il est impossible aux vibrions engloutis d'échapper, en quelque façon que ce soit, à l'action microbicide du milieu gastrique.

Il s'ensuit naturellement les conclusions ci-après : *a*) le contenu gastrique des lapins à la mamelle exerce sur les vibrions cholériques, aussi bien que sur d'autres espèces microbiennes non sporulées, une action bactéricide presque instantanée.

b) L'introduction directe des vibrions cholériques dans l'estomac des lapins à la mamelle reste entièrement inoffensive.

A quoi le contenu gastrique des jeunes lapins doit-il son action bactéricide si accusée?

On pourrait l'attribuer à l'acide chlorhydrique et aux acides organiques également libres de l'estomac. Il n'en est rien. Ce pouvoir bactéricide persiste après la neutralisation de ces acides et même après une forte alcalinisation ou le chauffage à 100° du contenu gastrique, ainsi que cela se passe, d'ailleurs, d'après London (1), dans le suc gastrique du chien.

Quelques recherches personnelles me portent à penser que les graisses neutres solubles dans l'eau, provenant de la saponification diastasique des graisses ou des glycérides du lait ingéré par les jeunes lapins, ne seraient pas étrangères au phénomène en question. Il s'agirait, tout au moins, de substances qui, par leur solubilité dans le chloroforme et l'éther, se comportent comme des acides gras ou des graisses neutres.

(1) Sur l'action bactéricide du suc gastrique, *Archives des Sc. Biol. de Saint-Pétersbourg*, 1897, **5**, p. 417.

V

Entérotropisme des vibrions et le soi-disant « choléra intestinal » des jeunes lapins.

Analysons à présent, de plus près, les côtés les plus caractéristiques et significatifs mis en évidence par l'étude du processus cholérique chez les jeunes lapins.

En passant en revue les données anatomiques et bactériologiques d'un grand nombre de protocoles d'autopsies, notre attention a été appelée d'une manière particulière par la répétition constante de faits dont la signification pathogénique apparaît évidente.

On croit en général, et E. Metchnikoff l'a dit le premier, que l'organe le plus atteint est l'intestin grêle (1).

Cependant, un examen plus attentif des petits lapins morts de choléra intestinal montre que l'organe le plus atteint est, au contraire, la dernière portion du canal digestif, c'est-à-dire : le côlon et le cæcum avec son appendice vermiforme.

Ces organes apparaissent remplis d'un contenu aqueux très abondant, renfermant beaucoup de flocons épithéliaux et de détritus cellulaires. Ces organes sont pâles, exsangues. Leurs parois sont amincies et transparentes ; à l'ouverture de l'abdomen, donnent l'impression d'un gros vers à soie de proportions presque gigantesques, replié sur soi-même, qui se trouverait blotti dans la cavité abdominale.

La longueur du côlon et du cæcum atteint, chez les lapins nouveau-nés, jusqu'à 8 à 9 centimètres. Son contenu liquide est aqueux, très pauvre en substances protéiques et en sels. En voici une analyse chimique :

Quantité du liquide recueilli, en cent. cubes		4,5
Poids spécifique à 15°		1,0551
Résidu fixe	°/₀	1,56
Cendres	—	0,88
Chlorure de sodium	—	1,24
Substances organiques	—	0,68

(1) *Loc. cit.* (IVe mémoire), p. 561.

La composition de ce liquide a plutôt les caractères d'un transsudat que d'un véritable exsudat inflammatoire. Les vibrions s'y trouvent, cependant, toujours en très grande quantité. Les ensemencements sur gélose inclinée donnent des cultures très denses et pures, mais celles en bouillon lactosé révèlent la présence constante d'anaérobies, surtout du *B. putrificus*, qui, comme nous avons vu plus haut, est un des premiers germes qui comparaissent dans le canal digestif des petits lapins.

L'appendice, lui-même, qui chez les lapins ne représente qu'une simple invagination du cæcum, est toujours distendu par l'abondance de ce contenu très riche en vibrions, en bactéries anaérobies et en éléments épithéliaux desquamés.

Le côlon, le cæcum et l'appendice représentent donc les vrais foyers du processus pathogène et le siège d'élection d'arrivée, d'élimination et de concentration des vibrions.

En quelques cas plus typiques, les vibrions se rencontrent seulement ici : tout le restant de l'organisme est stérile.

Mais aussitôt que l'on dépasse la valvule iléo-cæcale, le tableau bactériologique change toujours et soudainement de physionomie. L'intestin grêle, qui, chez les petits lapins nouveau-nés, atteint une longueur moyenne de 70 centimètres environ, apparaît la plupart des fois d'aspect normal. Tout au plus présente-t-il une légère congestion. Son contenu est représenté par un matériel dense, jaunâtre, muqueux ou crémeux, constitué d'éléments épithéliaux très abondants. Bien rarement il prend l'aspect diarrhéique. Les ensemencements démontrent que si dans beaucoup de cas le nombre des vibrions y est très considérable, il est toujours, cependant, de beaucoup inférieur à celui des vibrions renfermés dans le côlon et le cæcum. Ils ne sont pas rares les cas de choléra intestinal où tout l'intestin grêle — en remontant de la valvule iléo-cæcale jusqu'au pylore — reste très pauvre en vibrions ou même tout à fait stérile.

L'étude de la distribution des vibrions le long de l'intestin grêle est encore plus intéressante.

La diminution progressive des vibrions à partir de la valvule iléo-cæcale est un fait constant. A mesure que, de la valvule de Bohin on remonte le long du tube digestif, vers ses portions

supérieures, le nombre des vibrions diminue rapidement, souvent brusquement. Dans les parties les plus hautes, ils font totalement défaut et lorsqu'on arrive à l'anse duodénale, les ensemencements restent presque constamment stériles. J'ai constaté cette habituelle stérilité du contenu duodénal même lorsque la vésicule biliaire qui y débouche, renfermait des vibrions. De plus, on trouve souvent que, alors que la vésicule biliaire renferme une certaine quantité de vibrions, le sang est stérile.

En somme la distribution et la diffusion des vibrions le long du tube digestif ne s'effectue pas de haut en bas, c'est-à-dire à partir du pylore, comme ce serait le cas, si l'infection avait comme point de départ l'estomac. La diffusion des vibrions, au contraire, a lieu en sens opposé comme si son foyer de dispersion était le contenu cæcal.

En outre, la présence des vibrions dans la vésicule biliaire coïncide souvent, non seulement avec la stérilité absolue du duodénum, mais même avec la stérilité ou presque de tout l'intestin grêle. Car, dans ces cas, il ne serait plus possible de parler d'infection ascendante, c'est-à-dire de contamination des voies biliaires par le contenu intestinal contigu qui est stérile. Il ne peut être question que d'une infection descendante biliaire, à savoir de l'infection de la vésicule biliaire par le sang.

D'autre part, la bile des petits lapins est un bien médiocre milieu de culture, très peu propice pour les vibrions cholériques. Sa densité et sa couleur varient sensiblement d'un animal à l'autre; d'après, cependant, ce qui résulte de mes propres expériences *in vitro*, les vibrions peuvent y vivre, quoique très mal, et parfois ne s'y développent guère. Cette constatation rend encore moins vraisemblable leur provenance intestinale.

Si donc, l'infection biliaire est d'origine hématique — ainsi qu'on envisage généralement, à présent, tous les cas d'infection des voies biliaires — les vibrions administrés par la bouche doivent pénétrer préalablement dans la circulation du sang. Et, puisque au moment de l'autopsie, le sang reste habituellement stérile, on doit en conclure que ce dernier s'est déjà déchargé à ce moment des vibrions par ses émonctoires naturels : la bile et l'intestin. Il en est précisément ainsi

chez les cobayes qui ont reçu l'injection des vibrions dans le péritoine ou directement dans le sang.

Il s'ensuit que, même chez les lapins nouveau-nés, les vibrions se comportent comme chez les cobayes. Quelle qu'ait été leur voie d'entrée, les vibrions se dirigent toujours, en traversant la circulation générale, vers les parois intestinales qui représentent à la fois le but final de leur acheminement, endroit le plus favorable de l'organisme à leur développement, ainsi que leur principal organe d'excrétion ou porte de sortie.

On s'explique aisément que la présence des vibrions dans l'épaisseur même des parois intestinales si fragiles et délicates que celles des lapins nouveau-nés ne peut être exempte de conséquences. Les profondes altérations anatomiques du cæcum, du côlon et de l'appendice, qui sont évidemment les organes par lesquels s'accomplit l'exode des vibrions avec le plus de précocité et d'abondance, sont dues à l'action locale exercée par les vibrions eux-mêmes. Plus qu'une véritable et propre entérite cholérique, ils y provoquent une entéro-colite cholériforme.

L'aspect efflanqué et la paralysie de ces portions du tube digestif, rappelant les cas de choléra sec, sont provoqués par le même protéide toxique qui agit directement sur les plexus et sur les ganglions nerveux de la tunique musculaire. Celle-ci devient paralytique et laisse échapper le transsudat que l'on retrouve après à l'autopsie. Mais cette excrétion pariétale aqueuse est bien loin de constituer un excellent milieu de culture pour les vibrions. Quelques observations, *in vitro*, pratiquées avec du liquide cæcal stérilisé par le toluène et ensemencé ensuite avec des vibrions, m'ont convaincu qu'il ne permet pas aux vibrions de se développer facilement. Des ensemencements même très abondants y demeurent souvent inféconds. Les transports périodiques sur des tubes de gélose démontrent, dans beaucoup de cas, que le nombre des vibrions ensemencés y diminue progressivement et qu'ils finissent par disparaître au bout de vingt-quatre heures.

Même si on retire, avec une pipette, la sécrétion d'une ampoule cæcale renfermant des vibrions et si on la place, après centrifugation, dans une étuve à 37°, on n'y constate pas toujours, dans les jours suivants, un véritable développement

de vibrions. Souvent, après quelques jours, le liquide apparaît au contraire bien limpide et l'examen microscopique accuse une grande rareté de microbes.

Cela porte à penser que les vibrons renfermés dans l'abondante sécrétion du cæcum et du côlon, au lieu de s'être développés dans le même liquide, proviennent plutôt de la circulation générale.

Nous verrons, en effet, dans un prochain mémoire que, même chez les lapins adultes, les vibrions se développent de préférence non seulement dans le réseau lymphatique de la sous-muqueuse, mais aussi bien dans le réseau interlaminaire, c'est-à-dire compris entre les deux couches musculaires de l'intestin.

Cette circonstance explique également la paralysie musculaire que l'on observe dans le gros intestin des petits lapins. Rappelons qu'un cas identique a été signalé dans le précédent mémoire, chez un gros cobaye adulte, mort huit jours après une injection endoveineuse de vibrions. Le cæcum transformé, avec le côlon, en une sorte d'outre grosse et tendue renfermait plus de 50 cent. cubes de sécrétion aqueuse.

Il s'agit donc d'un phénomène toxique d'origine purement locale. Il ne peut pas relever, en effet, d'une intoxication générale, c'est-à-dire indirecte, due à la production d'une toxine cholérique soluble ayant pénétré dans la circulation. Dans ce cas, les petits lapins, dès le jour de l'ingestion des vibrions, devraient révéler les conséquences de l'inévitable empoisonnement par la perte progressive du poids de leur corps, jusqu'au moment de la mort. Au contraire, il arrive que les petits lapins infectés par la bouche ainsi que ceux qui le sont par la voie hypodermique, ne perdent pas de poids. Ils continuent même à gagner du poids, de 10 à 15 grammes par jour comme les petits lapins neufs de leur âge, tenus en observation comme témoins. Ce n'est que la veille seulement ou l'avant-veille de la mort, que se produit une légère chute du poids ou simplement un arrêt dans l'accroissement. A l'autopsie, non plus, on ne constate aucun signe de dépérissement organique ou de dénutrition. L'estomac est toujours plein de lait caillé et son poids moyen (16 à 18 grammes) ne présente pas de sensibles oscillations, bien que ces petits animaux cessent de têter à l'approche de la mort.

Dans l'ensemble de ces observations anatomiques et bactériologiques, on trouve aisément une confirmation de notre prémisse, à savoir que, même en les administrant par la bouche, les vibrions sont absorbés et parviennent à l'intestin sans traverser la barrière gastrique.

Mieux encore, cette conception pathogénique apparaît plus claire et probante par les autres résultats expérimentaux suivants. Personne n'a jusqu'ici, je crois, essayé d'introduire les vibrions dans l'organisme des lapins nouveau-nés par les voies parentérales, c'est-à-dire par la peau et le péritoine. Eh bien, les résultats anatomo-pathologiques et bactériologiques que l'on obtient sont identiques à ceux que nous venons d'examiner et qui se produisent chez les petits lapins infectés par la bouche. Les différences tiennent seulement au degré de résistance variable de chaque animal ou à la dose de vibrions employée. Les manifestations intestinales qui s'ensuivent en injectant les vibrions sous la peau ou le péritoine sont, au contraire, encore plus saillantes et caractéristiques que celles qui se produisent dans l'infection provoquée par la voie buccale.

Infection sous-cutanée.

La dose employée habituellement a été de une à deux anses normales. Lorsque la mort se produit promptement, en moins de vingt-quatre heures, par exemple, chez le petit lapin de quatre jours, le tableau anatomo-pathologique, bien que typique, apparaît un peu atténué. Le point d'inoculation est enflammé, turgide et pullule de vibrions. Tout l'appareil digestif est hyperémique et diarrhéique, l'intestin grêle est très rouge et renferme un liquide plein de vibrions, d'épithéliums desquamés et de globules rouges. Le cæcum et l'appendice même, ainsi que le côlon, sont turgides et gonflés par une sécrétion de couleur citrine, d'aspect muqueux, riche en vibrions et en éléments épithéliaux. Les cultures montrent les vibrions répandus un peu partout, même dans le sang. Mais dans le sang, comme dans le foie, la rate et le duodénum, leur nombre est toujours limité. Au contraire, le long de l'intestin grêle ainsi que dans le cæcum, dans l'appendice et dans le

côlon, la quantité des vibrions est aussi abondante que dans les cas de choléra intestinal d'origine buccale.

Si les petits lapins sont plus âgés et ont, par exemple, six jours, le tableau bactériologique, même si la mort s'est produite après vingt-quatre heures seulement, se rapproche davantage du choléra intestinal typique : les colonies données par les ensemencements du sang sont beaucoup plus rares, ainsi que le sont celles des ensemencements du contenu duodénal et des premières portions de l'intestin grêle. Mais le contenu du cæcum et du côlon est déjà transformé en une épaisse culture de vibrions.

A mesure que la maladie se prolonge, comme il arrive chez les cobayes, le processus vibrionien devient plus caractéristique, tandis que les vibrions se concentrent de plus en plus sur des points déterminés du tube digestif.

Voici le protocole d'une expérience parmi les plus typiques :

Lapin de trois jours, poids : 65 grammes.

28 juin. Injection sous-cutanée d'une anse normale de vibrions. La marche du poids du corps, du 28 juillet au 7 août, jour de sa mort, a été la suivante :

28 juin	65 gr.	1er juillet	160 gr.	5 juillet	190 gr.
29 —	75 gr.	2 —	170 gr.	6 —	200 gr.
30 —	100 gr.	3 —	175 gr.	7 —	180 gr.
30 —	120 gr.	4 —	180 gr.		

Durée de l'infection : dix jours.

Autopsie exécutée tout de suite : A l'ouverture de l'abdomen, le cæcum apparaît immédiatement; il est turgide, fluctuant, semblable à un gigantesque vers à soie. Le côlon aussi présente le même gonflement et est plein d'un liquide aqueux. On retire du cæcum et du côlon 10 cent. cubes de liquide. Tout le tube digestif est congestionné, de couleur rosée ou rouge brique avec contenu diarrhéique. Le duodénum semble normal, ainsi que l'estomac et la rate. La vessie urinaire est vide.

Tableau bactériologique : (1)

Cavité buccale . .	Vibrions.		Estomac	0	—
Péritoine	30 colonies de V.		Duodénum	0	—
Sang	0	—	Jéjunum (I)	0	—
Foie	8	—	Jéjunum (II) . . .	0	—
Bile	7	—	Iléum	∞	(voile de V.)
Rate	2	—	Cæcum	∞	—
Urine	0	—	Appendice	∞	—
Reins	0	—	Côlon	∞	—

(1) Les indications numériques des cultures ont une simple valeur comparative, les ensemencements ayant été exécutés toujours sur des tubes de gélose inclinée avec une même quantité, chaque fois, de matériel.

Infection péritonéale.

Beaucoup plus clair et démonstratif est le tableau que l'on obtient après les injections de vibrions dans la cavité péritonéale.

En voici un exemple :

Lapin de 4 jours :

26 juillet.	Poids : gr.	90	Injection péritonéale d'une anse de vibrions.
27 —	—	95	
28 —	—	100	
29 —	—	115	
30 —	Mort.		

Autopsie immédiate. — *Tableau abdominal du choléra.* — Cæcum et côlon très détendus et pleins d'un liquide riche en vibrions et flocons épithéliaux, semblable à celui du cas précédent. Le péritoine est d'apparence normale, avec une faible quantité de lymphe. Le paquet intestinal est en quelques points, hyperémique et diarrhérique. La vessie urinaire renferme quelques gouttes d'urine dense et albumineuse. Le sang est noir, très dense. On a, dans l'ensemble, l'impression que ce tableau est encore plus caractéristique de celui que l'on constate chez les petits lapins après l'administration buccale des vibrions.

Tableau bactériologique :

Cavité buccale . .	Vibrions ∞	Estomac	Vibrions 0
Péritoine	— 0	Duodénum	— 0
Sang	— 0	Jéjunum (I) . . .	— 0
Foie	— 0	— (II) . . .	8 colonies de V.
Bile	— 0	Iléum.	∞ —
Rate	10 colonies de V.	Cæcum	∞ —
Reins	2 —	Appendice	∞ —
Urine	0 gélose + eau peptonée.	Côlon.	∞ —

Le tableau anatomo-pathologique ainsi que le tableau bactériologique des petits lapins inoculés sous la peau ou dans le péritoine, ne sont nullement différents de ceux que présentent les petits lapins infectés par la bouche : mêmes lésions au niveau du gros intestin, même tendance des vibrions à disparaître du sang et des cavités séreuses pour se diriger, se concentrer et se multiplier dans les portions les plus basses du tube digestif. Ce qui signifie que la manière de se comporter des vibrions dans l'organisme est la même dans tous les cas ; que les vibrions pénètrent en traversant les surfaces muqueuses ou par la peau ou le sang, les localisations électives et les

lésions qui s'ensuivent dans le tube digestif sont identiques.

En effet, même les injections endoveineuses exécutées au moyen d'aiguilles très fines dans la jugulaire externe, aboutissent aux mêmes résultats, aux mêmes localisations. Cependant, il faut employer des doses très petites pour éviter une issue mortelle trop rapide, sous forme de septicémie vibrionienne.

Ces expériences sur les petits lapins confirment donc cet entérotropisme caractéristique des vibrions cholériques, que j'ai mis en évidence dans mes précédentes expériences sur les cobayes. Chez les petits lapins à la mamelle, nous avons, en outre, la démonstration que les vibrions peuvent atteindre et pénétrer dans les parois intestinales par la circulation générale, alors même que les vibrions ont eu comme point de départ la surface muqueuse de la porte d'entrée du tube digestif.

J'ai essayé même d'injecter les vibrions directement dans une anse de l'intestin grêle. Le résultat est toujours le même : mort en un ou deux jours ; stérilité du sang, de l'estomac et du duodénum, maximum de concentration des vibrions dans les dernières portions du tube digestif. L'acte opératoire, dans ces expériences, bien que très délicat, est toujours très simple. Cependant, malgré l'extrême finesse de l'aiguille dont on se sert et la petitesse de la perforation que l'on pratique dans la paroi intestinale, on ne peut éviter d'introduire les vibrions directement dans la circulation ou de contaminer le péritoine.

J'ai été amené ainsi à essayer de provoquer une infection ascendante intestinale, par la voie rectale.

Les recherches physiologiques de Grutzner (1), confirmées dans la suite par d'autres auteurs, ont montré que les particules inertes injectées dans les dernières portions du tube digestif remontent rapidement l'intestin et parviennent, en peu de temps, jusqu'à l'estomac, malgré les mouvements péristaltiques des parois entériques. Les expériences de Uffenheimer (2) et de Dieterlen (3) ont montré qu'il en est de même pour les microbes.

(1) Zur Physiologie der Darmbewegung. *Deutsche med. Woch.*, 1894, n° 48, p. 897.

(2) Weitere Studien über die Durchlässigkeit des Magendarmkanales für Bakterien. *Deutsche. med. Woch.*, 1906, p. 1851.

(3) Ueber das Aufwärtswandern der Bakterien im Verdauungskanal und seine Bedeutung für die Infektion des Respirationstraktus. *Centr. für Bakter*, 1908, **45**, p. 385.

On pouvait donc prévoir que les vibrions, ainsi introduits abondamment par le rectum, devaient remonter le tube digestif. Il n'en est rien. Mes essais, bien que pratiqués sur de tout petits lapins de trois jours, n'ont donné aucun résultat dans le sens prévu. Les animaux ont toujours survécu. L'introduction rectale, même de quantité importante de vibrions, est toujours résultée inoffensive.

Cela signifie que la muqueuse rectale n'absorbe, ni ne cultive les vibrions et que tout le tube digestif se comporte de même lorsque les vibrions y parviennent par la surface. En sacrifiant les animaux, quelques heures après l'injection rectale des vibrions, on retrouve, en effet, ces derniers non seulement dans le contenu du côlon, mais même dans celui de l'iléum et dans les portions inférieures du jéjunum, sans que leur présence donne lieu, toutefois, à aucune manifestation pathologique. On peut en conclure que, même chez l'homme, le choléra ne peut pas se propager par la voie anale. Néanmoins, on a pensé récemment à la possibilité de pareil mode de contagion pour la dysenterie.

R. Bencke (1) ne croit pas que les bacilles dysentériques, si sensibles aux acides, puissent réussir à traverser vivants l'estomac, de façon à parvenir à l'intestin par la voie buccale. Il pense, au contraire, que l'invasion du gros intestin par ces bacilles peut avoir lieu par l'ouverture anale. C'est un raisonnement par exclusion ; or, ce n'est pas exact qu'il ne reste pas aux bacilles dysentériques d'autre voie de pénétration que la voie ascendante, si la voie descendante leur est barrée par l'acidité gastrique. Car dans une note préliminaire, datant de 1916, j'ai montré la possibilité pour le bacille dysentérique, à l'instar des vibrions cholériques, d'atteindre sa localisation élective, c'est-à-dire le gros intestin, par la circulation générale (2).

Le mode d'action du bacille dysentérique, ainsi que des autres microbes des maladies intestinales envisagées jusqu'ici comme produites par des germes pathogènes ingérés d'abord et se développant ensuite dans le tube digestif, est vraisemblablement analogue à celui du vibrion cholérique.

(1) Zur Pathogenese, Behandlung und Prophylaxie der epidemischen Ruhr. *Münch. med. Woch.*, 1917, **64**, p. 1277.

(2) La pathogénie du choléra. *La Presse Médicale*, 16 novembre 1916.

Tous ces microbes ne traversent pas la barrière gastrique. Absorbés, comme les vibrions par les lymphatiques, à travers la surface muqueuse bucco-pharyngienne, ils atteignent et attaquent les parois intestinales seulement par la voie indirecte de la circulation générale.

VI

Comment se développe l'entéro-cholite cholériforme chez les jeunes lapins.

Quelles sont les voies que suivent les vibrions déposés sur la muqueuse buccale, pour atteindre l'intestin?

Exclue la voie plus directe et qui, jusqu'ici, était apparue comme la plus naturelle, c'est-à-dire la voie gastrique, il était nécessaire de connaître le parcours suivi par les vibrions, de la bouche jusqu'à l'émonctoire intestinal. L'intérêt de cette recherche est d'autant plus grand que les autres microbes, pathogènes ou non, qui arrivent en contact de la muqueuse buccale suivront vraisemblablement le même chemin.

L'exode des vibrions de la muqueuse buccale s'effectue sans doute très précocement. Ils parviennent aux parois intestinales dans un laps de temps relativement court. Mais tout cela s'accomplit très irrégulièrement d'un animal à un autre.

Au contraire, les vibrions développent leur action pathogène directe sur l'intestin avec une grande uniformité. Les petits lapins d'une même portée meurent tous presque simultanément, même lorsque quelques-uns seulement d'entre eux ont été infectés directement; les autres naturellement s'infectent tout de suite après, en prenant la contagion à la mamelle maternelle. L'invasion, cependant, des différents organes par les vibrions ne procède pas avec autant d'uniformité. Parfois, on ne trouve nulle part de vibrions, vingt-quatre heures après, alors que dans d'autres cas, en moins de six heures, tout l'organisme en est envahi.

On est ainsi obligé, dans ces recherches, d'employer un nombre important d'animaux et de suivre une technique appropriée.

En effet, pour avoir la certitude de déceler les vibrions qui peuvent se trouver dans les organes en nombre parfois très exigu, je m'aperçus bientôt qu'il était nécessaire d'ensemencer dans l'eau peptonée la totalité des organes. Le mode opératoire, d'ailleurs, était très simple. Je fis usage de tubes à eau peptonée à parois très épaisses, plus grands que les ordinaires, contenant une certaine quantité de verre pilé. Un gros fragment d'organe, ou l'organe tout entier y est introduit et ensuite broyé au moyen d'une robuste baguette de verre. Le sang du cœur et l'urine étaient versés dans des fioles d'eau peptonée.

Les résultats de cette recherche, poursuivie sur 57 petits lapins appartenant à 7 portées différentes, ont été les suivants :

Les vibrions administrés par la bouche, même en très petite quantité, sont rapidement absorbés par les lymphatiques. Après trente minutes, on les retrouve déjà dans les lymphatiques sous-séreux de la plèvre viscérale. Pour mettre en lumière leur présence on expose directement à la flamme du gaz un verre porte-objet, et on l'applique aussitôt qu'il est chaud sur la surface de la séreuse viscérale ou pariétale, comme si on voulait en prendre l'empreinte. En procédant avec une certaine adresse on arrive à retirer la lamelle de façon qu'elle emporte adhérent non seulement tout le revêtement endothélial mais encore la couche plus profonde de la séreuse jointe à des fragments de son réseau lymphatique. Après coloration avec la solution de Ziehl diluée, on procède à la recherche des vibrions.

A l'égard de la plus ou moins grande fréquence des vibrions, il apparaît qu'il n'y a pas de différence entre un poumon et l'autre d'un même animal.

Les lymphatiques de la sous-séreuse renferment les vibrions pendant plusieurs heures. Ils disparaissent souvent après une, deux, trois heures, pour réapparaître même plus tard, à différents intervalles, par exemple : après douze heures ou à l'approche de la mort.

Les préparations *par empreinte* exécutées avec la plèvre viscérale des petits lapins qui meurent de choléra intestinal révèlent presque toujours la présence de vibrions. Même les préparations *par empreinte* du péritoine pariétal contiennent

souvent des vibrions. Passé deux heures, les vibrions ont déjà atteint les glandes lymphatiques du cou et après six heures ils peuvent se trouver dans le foie et les reins. Cela indique qu'à ce moment, ils peuvent avoir déjà fait irruption dans la circulation, bien que les cultures du sang du cœur restent habituellement stériles.

Il est vraisemblable que l'invasion de la circulation générale s'accomplit peu à peu, peut-être par unités et que les vibrions entraînés par la lymphe ou le sang circulant, sont amenés immédiatement vers les capillaires terminaux des différents organes. Il paraît, cependant que dans beaucoup de cas, la sixième heure après l'infection buccale, coïncide avec la plus grande dissémination des vibrions dans l'organisme. Une fois, chez un petit lapin sacrifié, précisément dix heures après une administration moyenne par voie buccale, je constatai que les vibrions étaient répandus dans tous les organes et le sang. On aurait dit un cas de septicémie à vibrions!

Au bout de onze à douze heures, il se produit assez souvent une première apparition des vibrions dans le canal digestif. Les points où se produit particulièrement cette invasion sont : l'iléum (c'est-à-dire l'extrême portion de l'intestin grêle, qui débouche dans le *sacculus rotundus*, au niveau de la valvule iléo-cæcale) et l'appendice. Mais lorsque les vibrions sont parvenus à ces organes, on en retrouve aussi, mais en nombre très restreint, dans le cæcum et le côlon.

Vingt-quatre heures après, la concentration des vibrions est déjà établie définitivement dans les portions inférieures de l'intestin : l'iléum, le cæcum, le côlon et l'appendice, ainsi qu'il résulte non seulement des ensemencements, mais encore de l'examen microscopique direct. Dans l'un et l'autre cas c'est dans le contenu de l'iléum et de l'appendice que l'on constate la présence des vibrions la plus abondante.

A partir de ce moment, l'intestin commence à accuser des signes d'altération. L'anse duodénale, ainsi que tout le reste de l'intestin grêle, sont stériles ou à peu près. Le cæcum avec son appendice et le côlon apparaissent déjà considérablement gonflés et pleins de ce liquide louche bien caractéristique : c'est l'hypersécrétion pariétale qui débute en même temps que commence l'excrétion des vibrions. Ce transsudat pullule en effet

de vibrions et de ces habituels germes anaérobies intestinaux. Ensemencé sur gélose il donne lieu au développement d'épais voiles de vibrions très purs.

Au bout de trente-six heures, ces localisations des portions inférieures de l'intestin sont encore plus accentuées, le transsudat est plus copieux et les vibrions commencent à remonter ou à être éliminés, au-dessus de l'iléum le long du trajet du jéjunum. Celui-ci, à ce moment, commence à accuser des symptômes morbides, par le contenu devenu diarrhéique et par l'hyperémie et la distension de ses parois. Les portions supérieures de ce même intestin, ainsi que le duodénum et les autres organes demeurent, encore dans cette phase, stériles et d'apparence normale. Et chose encore plus digne de remarque à ce moment, c'est-à-dire 36 à 48 heures après l'administration buccale, les petits lapins conservent toute entière leur vivacité, quoique leur gros intestin représente une prodigieuse culture de vibrions. Après quarante-huit heures, les conditions de l'intestin peuvent s'aggraver jusqu'au moment de la mort, qui se produit habituellement entre la troisième et la quatrième journée, parfois plus tard. Très rarement quelques sujets finissent par échapper, mais dans ces cas très rares de survie, l'intestin des petits lapins demeure longtemps le siège d'une excrétion de vibrions. Ils deviennent alors des porteurs de germes, ainsi que j'en ai constaté un cas très net chez un petit lapin de vingt jours, du poids de 260 grammes, quinze jours après le début de l'infection expérimentale.

Ces cas, d'ailleurs, de survie sont excessivement rares et ne se produisent en général que chez les petits lapins où la contagion buccale a été indirecte, par la mamelle maternelle.

Mais si à ces mêmes petits lapins on administre par la bouche une petite quantité de bacilles typhiques ou de colibacilles, ils meurent tous indistinctement d'entéro-cholite chlolériforme et présentent un tableau anatomo-pathologique beaucoup plus accentué et une généralisation extraordinaire de vibrions dans les différents organes et même dans le sang.

Ce sont les microbes favorisants, mis en lumière par Metchnikoff, qui entrent en jeu, en rendant plus grave le processus intestinal déclenché par la contagion prise à la mamelle.

Le B. coli, d'après mon expérience, exerce d'une façon certainement plus intense ce rôle favorisant.

La présence des bacilles typhiques favorise particulièrement la dissémination des vibrions ; mais à la différence du B. coli, ils disparaissent après avoir facilité la tâche des vibrions. Leur recherche dans tous les organes demeure infructueuse. Il se répète ici le même phénomène observé par Metchnikoff, à l'égard des microbes favorisants qu'il employait pour vaincre la résistance des petits lapins infectés par la bouche avec le vibrion de Massaoua. A la mort de ces animaux Metchnikoff ne retrouve plus, parmi les vibrions, les microbes favorisants.

Comme on sait, Metchnikoff a attribué à ces microbes la fonction de faciliter les premiers moments de la vie parasitaire du vibrion dans l'intestin. Aussitôt que le vibrion est parvenu à s'acclimater dans ce nouveau milieu, ils deviendraient inutiles ; leur disparition, cependant, n'arrêterait plus l'évolution du processus morbide.

A l'état actuel de nos connaissances nous ne pouvons plus envisager l'action favorisante de ces microbes, s'exerçant à l'intérieur de l'intestin. Elle doit s'expliquer dans les tissus eux-mêmes des parois entériques, qu'ils doivent atteindre par la circulation générale à l'instar des vibrions.

Il est probable que cette action favorisante vis-à-vis des vibrions déjà nichés dans les parois intestinales puisse être provoquée par toutes sortes de circonstances. Le cas suivant nous autorise à l'admettre. A deux lapins de quatre jours, pesant respectivement 105 et 95 grammes, et faisant partie d'une portée de six sujets nés robustes et bien portants, on avait administré, le 5 juin, une demi-culture de vibrions. Des autres petits lapins de la portée, deux avaient ingéré différentes doses de vibrions tués à 70° et les deux restant étaient restés comme témoins.

Plusieurs jours se passèrent sans qu'aucun de ces petits lapins ait présenté symptôme de maladie. Ils gagnaient tous les jours du poids. Au bout de dix jours, le 15 juin, meurt le petit lapin aux 105 grammes du début, devenus sur ces entrefaites 185 grammes. A la veille de la mort il avait perdu 20 grammes. L'autopsie montra qu'il s'agissait d'un cas authentique de choléra intestinal, d'un cas même plus grave que

d'habitude, quoiqu'il ait eu une évolution exceptionnellement longue. Le sang était dense, noir, le cæcum et le côlon très gonflés, avec des parois couvertes d'ecchymoses; j'en retirai 10 cent. cubes de liquide aqueux. Le duodénum et tout l'intestin grêle étaient cette fois encore bien congestionnés, chose tout à fait exceptionnelle ; la vessie complètement rétrécie, avec quelques gouttes d'urine trouble qui coagula en bloc à la chaleur. Le sang et le duodénum, comme d'habitude, étaient stériles ; dans le jéjunum on rencontrait très peu de vibrions : mais à partir de l'iléum ils y étaient à foison, particulièrement dans le côlon et l'appendice vermiforme.

Toutefois, la constatation qui me parut le plus digne de remarque fut la présence d'une grande quantité de B. coli dans le duodénum et dans quelques autres parties du tube digestif. L'estomac était privé de microbes sans spores, mais l'examen de son contenu démontra que le petit lapin avait déjà commencé à brouter de l'herbe !

VII

Pourquoi les lapins adultes ne contractent pas le « choléra intestinal ».

D'après les expériences que je viens de résumer, ce qu'on a appelé « choléra intestinal » des jeunes lapins n'est qu'une simple, mais typique manifestation morbide de l'entérotropisme des vibrions.

Il s'agit d'un phénomène de « tactisme » microbien qui est certainement particulier au vibrion. Nous verrons, en effet, dans un prochain mémoire que, par exemple, les bacilles du charbon virulents, administrés par la bouche aux lapins à la mamelle, sont incapables de produire une action quelconque dans le tube digestif. Ils sont tués immédiatement par le milieu gastrique et ne parviennent jamais à l'intestin ni directement en traversant l'estomac, ni par la voie indirecte de la circulation générale.

Les vibrions cholériques, au contraire, pénètrent par la muqueuse buccale et se dirigent tout de suite, par les voies

lymphatiques et les vaisseaux sanguins, vers des points déterminés de l'intestin en lésant et en paralysant les parois.

Puisque le cæcum et le côlon, chez les petits lapins à la mamelle, ressentent plus précocement et plus profondément l'action pathogène du protéide des vibrions, il n'est pas exact d'attribuer, comme il a été fait jusqu'ici, à ce processus qui en résulte le caractère et la désignation tout court d'entérite cholérique. Le nom qui lui convient bien mieux est celui d'entérocholite, sous lequel nous l'avons déjà désigné.

Nous sommes donc bien loin de la reproduction expérimentale d'un tableau cholérique véritable. Il n'est plus guère possible d'attribuer à l'absence d'hypothétiques microbes antagonistes, dans la flore intestinale des jeunes lapins, la plus grande sensibilité de l'intestin de ces petits animaux pour les vibrions cholériques.

Mais une fois écartée l'intervention hypothétique de microbes antagonistes ou adjuvants, on doit se demander à quoi tiendrait la résistance si tenace des lapins adultes contre l'invasion intestinale des vibrions.

Nous avons, en effet, déjà dit que lorsque les jeunes lapins s'approchent du dixième jour de vie, ils peuvent ingérer sans danger des quantités considérables de vibrions. Ils sont déjà réfractaires au « choléra intestinal ». A quoi tient-elle cette propriété? D'après les résultats de mes recherches, elle tiendrait, d'une part, à une plus forte résistance que les parois intestinales acquerreraient elles-mêmes avec l'âge, et de l'autre, à l'apparition dans le sang et dans les humeurs de propriétés bactéricides pour les vibrions.

Que l'intestin des jeunes lapins soit plus robuste et résistant vers le dixième jour d'existence, cela ne se discute pas. A ce moment ils commencent à manger des aliments solides, de l'herbe, du son; ils ont traversé sans nul doute la période d'extrême vulnérabilité congénitale de leur très faible tube digestif. Parallèlement à l'acquisition de cette résistance physiologique inhérente aux parois intestinales, nous voyons se produire l'autre facteur, l'apparition du pouvoir microbicide dans le sang circulant. On savait déjà que, chez les lapins adultes, le sérum sanguin est doué d'un énergique pouvoir vibrionicide.

Dans les tableaux suivants on remarquera la différence existant dans l'action du sérum sanguin du lapin adulte et du lapin à la mamelle vis-à-vis du vibrion cholérique.

I. — **Sérum de lapin adulte (Poids : 1 kil. 650).**

	ENSEMENCEMENT SUR		
	Gélose	Gélatine	Eau peptonée
Tout de suite après le mélange . .	2.880	∞	+
Après 1 heure.	5	2	+
— 2 heures	0	0	0
— 8 —	0	0	0
— 24 —	0	0	0

II. — **Sérum de jeune lapin (âge : 6 jours ; poids : 80 gr.).**

	ENSEMENCEMENT EN	
	Plaque de gélose	Eau peptonée
Tout de suite après le mélange.	4.355	+
Après 2 heures	30	+
— 8 —	1	+
— 24 —	∞	+

On remarque, en effet (1), que chez les lapins nouveau-nés le pouvoir vibrionicide, bien qu'évident, est assez faible et très fugace. Au bout de vingt-quatre heures d'étuve, le sérum ensemencé avec des vibrions représente déjà une très riche culture, avec son voile superficiel.

En recherchant à éclaircir l'origine de cette pauvreté des jeunes lapins en pouvoir vibrionicide, j'ai pratiqué quelques expériences, d'après lesquelles cette déficience se rattacherait plus particulièrement à la faible quantité de complément existant chez les lapins nouveau-nés.

(1) A 1 cent. cube de sérum on ajoutait une anse d'émulsion de vibrions, obtenue en diluant 1/10 de culture de vibrions sur gélose (de 24 heures) en 10 cent. cubes de solution physiologique. Avec la même anse, on exécutait les prélèvements périodiques.

Le dosage du complément a été réalisé avec du sérum de lapin adulte comparé à du sérum de cobaye neuf, dans un système hémolytique équilibré.

Voici les résultats :

A

	NUMÉROS DES TUBES					
	1	2	3	4	5	6
Globules rouges de mouton, 5 p. 100 . . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c	1 c. c.
Hémolysine 1 : 120 . .	1 c. c.	1 c c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Complément de cobaye	0,025	0,050	0,075	0,1	0,2	0,25
Résultat.	±	+	+	+	+	+

B

	NUMÉROS DES TUBES					
	1	2	3	4	5	6
Globules rouges de mouton, 5 p. 100 . . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Hémolysine 1 : 120 . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Complément de lapin adulte	0.025	0,050	0,075	0,1	0,2	0,25
Résultat.	—	—	—	+	+	+

C

	NUMÉROS DES TUBES					
	1	2	3	4	5	6
Globules rouges de mouton, 5 p. 100. . . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c	1 c. c.
Hémolysine 1 : 120 . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Complément de lapin de 24 heures	0,025	0,050	0.075	0,01	0,2	0,25
Résultat.	—	—	—	—	—	±

D

	Numéros des tubes					
	1	2	3	4	5	6
Globules rouges de mouton, 5 p. 100. . . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Hémolysine 1 : 120 . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Complément de lapin de 3 jours	0,025	0,050	0,075	0,1	0,2	0,25
Résultat.	—	—	—	—	+	+

En considérant la quantité de complément possédée par le sérum de cobaye comme 1, le sérum de lapin adulte aura une valeur 1/2 de complément, le sérum de lapin à la mamelle de trois jours la valeur 1/4 et le sérum d'un petit lapin d'un jour seulement une valeur comparative égale à 1/10. Ces chiffres concordent suffisamment avec les précédentes, concernant le pouvoir vibrionicide du sérum pour ne pas voir entre elles un rapport certain.

Au fur et à mesure que le lapin nouveau-né grandit, augmente donc parallèlement le pouvoir vibrionicide de son sérum et la valeur de son complément. Entre huit à dix jours ces deux pouvoirs ont atteint les valeurs qu'ils possèdent chez le lapin adulte, c'est-à-dire au moment précis où les jeunes lapins commencent à perdre leur sensibilité congénitale pour le choléra intestinal. Cela nous signale le moyen dont se prévaut la nature pour défendre les parois intestinales du lapin adulte contre l'invasion, par la circulation générale, des vibrions cholériques pénétrés dans le sang.

La connaissance de cette circonstance acquise, nous pouvons essayer de résoudre encore une autre controverse au sujet de l'immunisation anticholérique non seulement chez les animaux, mais encore chez l'homme.

Ce mécanisme n'est pas encore parfaitement éclairci : il en est résulté des doutes qui ont, à leur tour, engendré beaucoup de méfiance même à l'égard de l'efficacité de la vaccination humaine.

Ces méfiances sont venues surtout à la suite de la publication de quelques expériences de Pfeiffer et Wassermann (1), d'où il résultait comme démontrée l'impossibilité d'obtenir l'immunisation de l'organisme contre le choléra intestinal.

Selon ces auteurs, en effet, les cobayes immunisés par la voie sous-cutanée ou péritonéale, c'est-à-dire traités avec des sérums anticholériques, même très actifs, ne manifestent aucune résistance contre le choléra intestinal donné par la bouche d'après la méthode de Koch.

La raison en serait, d'après ces mêmes auteurs, parce que les vibrions se mettraient dans l'intestin hors de l'influence des anticorps, c'est-à-dire à l'abri des humeurs de l'organisme, dont ils ne seraient pas ainsi atteints ou influencés.

Les résultats très peu constants obtenus plus tard par Metchnikoff, dans ses tentatives de sérothérapie et de vaccination active des lapins à la mamelle, ont aussi contribué à donner plus de consistance à ces incertitudes.

Nous sommes, à présent, à même de nous rendre compte exact de tout cela.

Nous avons déjà dit, dès le premier mémoire, ce que l'on doit penser du prétendu choléra intestinal obtenu par la méthode de Koch. On sait, désormais, que la teinture d'opium injectée dans le péritoine paralyse les leucocytes et supprime l'immunité des cobayes même s'ils ont été vaccinés contre les vibrions. Ce qui en résulte ce n'est qu'une banale infection générale. On ne peut donc prétendre qu'en ce cas, l'immunisation préalable puisse faire quelque chose, alors que l'opium intervient toujours en suspendant la défense leucocytaire.

Quant aux insuccès sérothérapiques et de vaccination chez les lapins à la mamelle, ils s'expliquent aisément après la démonstration, que nous venons de donner, sur l'absence ou l'extrême pauvreté du pouvoir alexinique dans le sang de ces jeunes animaux.

On sait que le pouvoir bactéricide ou bactériolytique du sérum d'un animal immunisé est dû à l'effet combiné de deux substances douées de propriétés différentes : l'alexine ou complément qui devrait être toujours présente dans le sérum

(1) Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. *Zeits. für Hygiene*, 1893, **14**, p. 46.

normal et la sensibilisatrice ou fixatrice spécifique, qui se produit par effet de l'antigène et qui, à son tour, sert à fixer l'alexine sur le corps des microbes.

Mais si les leucocytes des lapins nouveau-nés sont congénitalement dépourvus d'alexine ou sont encore incapables d'en produire, il est évident que la fixatrice spécifique produite par les injections vaccinantes n'aura rien à fixer sur le corps des bactéries. Dans ce cas les vibrions vivants, injectés ou pénétrés dans l'organisme, en quelque façon que ce soit, ne subiront aucune atteinte comme s'il n'y avait pas eu de vaccination.

Voici pourquoi il ne peut y avoir de vaccination active d'animaux dont les leucocytes, ainsi que cela se vérifie chez les petits lapins à la mamelle, sont incapables de libérer de l'alexine.

Même l'inconstance des résultats sérothérapiques s'explique en tenant compte de nos connaissances actuelles. On sait que les sérums riches en anticorps (sensibilisatrice ou fixatrice spécifique), mais dépourvus d'alexine (qui devient entièrement inactive par le vieillissement), peuvent agir sur les microbes seulement par l'alexine produite par les organismes qui viennent d'être inoculés. L'inoculation elle-même du sérum stimule électivement les leucocytes (1), qui, en plus d'attaquer directement les microbes au moyen des opsonines et de les phagocyter, contribuent, avec la sécrétion des alexines, à activer le pouvoir bactéricide du sérum. Il est évident que, chez les lapins nouveau-nés, dont les leucocytes ne sécrètent pas encore d'alexine, l'action du sérum anticholérique ne pourra s'exercer d'aucune façon, sur les vibrions parvenus dans le sang de ces animaux ou logés dans leurs tissus.

Ces notions étant déjà acquises, je n'ai pas même essayé d'immuniser activement ou passivement les jeunes lapins contre le « choléra intestinal » par les méthodes habituelles. Mon but d'ailleurs ne visait pas la question de l'immunisation en elle-même, mais simplement à obtenir, à l'aide de lapins nouveau-nés immunisés par la production d'anticorps dans le sang, la démonstration d'une thèse pathogénique, à savoir : les vibrions administrés par la bouche, pour parvenir à l'intestin

(1) SANARELLI, Moyens de défense de l'organisme contre les microbes. Ces *Annales*, 1893, p. 251.

et y provoquer ce qu'on a appelé le « choléra intestinal », doivent passer nécessairement par la circulation générale.

La méthode que j'ai employée a consisté dans l'immunisation très solide des mères, pour avoir des portées de petits lapins vaccinés suffisamment par voie héréditaire.

Aussitôt après la saillie de quelques lapines, je les ai soumises à des injections périodiques sous-cutanées ou endoveineuses de cultures de vibrions tués à 56° ou par addition de toluène. Avec beaucoup de ménagements on arrive au terme de la gestation, qui est de trente jours, sans accidents. Au moment où les lapines mettent bas, le pouvoir agglutinant de leur sang est assez élevé, marquant entre 1 : 2.200 à 1 : 2.500. Chez les petits nouveau-nés il est beaucoup plus bas, oscillant entre 1 : 500 à 1 : 1.000 et baisse de jour en jour.

En soumettant ces lapins nouveau-nés à l'épreuve de la contamination par la bouche, pas plus tard que le troisième jour, ils résistent parfaitement. A un de ces petits lapins, de trois jours à peine et du poids de 90 gr. j'ai administré jusqu'à 3 cultures entières de vibrions, sans parvenir à le rendre malade !

Plusieurs petits lapins, qui avaient reçu les vibrions directement dans le péritoine, dans l'intestin grêle et dans le cæcum, ont également survécu.

En sacrifiant quelques-uns de ces lapins nouveau-nés de quarante-huit heures (dont le pouvoir agglutinant du sérum était de 1 : 1.000), respectivement douze heures, vingt-quatre heures et trois jours après l'injection des vibrions, j'ai pu suivre le sort de ces derniers.

Dans le petit lapin sacrifié après douze heures seulement, on ne constatait de vibrions, en dehors de la bouche, qu'en toute petite quantité (les ensemencements donnent quelques colonies sur les tubes de gélose) dans le contenu de l'iléum, du cæcum et de l'appendice. Le petit lapin tué au bout de vingt-quatre heures présentait une absolue stérilité de tous les organes. Les ensemencements de la muqueuse buccale donnèrent seulement quelques colonies de vibrions. Chez le nouveau-né tué trois jours après l'infection, les organes présentèrent la même stérilité et les ensemencements de la muqueuse buccale montraient, par leur stérilité, que les vibrions avaient été

annihilés dans la bouche elle-même. Néanmoins le cæcum et le côlon, bien que stériles, apparaissent quelque peu distendus par un liquide abondant constitué par de la sécrétion aqueuse, aux cas de choléra intestinal à leur début. Il en était de même de l'appendice. Il devait s'agir vraisemblablement de légères altérations provoquées par l'excrétion des vibrions absorbés vivants, tués tout de suite par les humeurs et vite expulsés par l'intestin, au niveau des segments intestinaux d'élection.

Parmi les innombrables bactéries que l'on rencontre dans les matières fécales, et que l'on considère comme des germes incultivables dans les milieux ordinaires, beaucoup ne sont peut-être que des microbes morts, expulsés par cet émonctoire naturel qui est l'intestin? A. Klein (1), d'Amsterdam, a exprimé une opinion analogue. Il s'ensuivra que si ces microbes expulsés sont toxiques, ils provoqueront, dans la muqueuse intestinale qu'ils traversent, cette action pathogène que nous avons signalée au début de notre troisième mémoire.

J'ai tenu à étudier encore, chez ces petits lapins hérédo-immunisés, la manière de se comporter des sucs intestinaux vis-à-vis du vibrion cholérique.

A l'aide de pipettes très effilées on recueille les sécrétions plus ou moins fluides que l'on rencontre dans le cæcum et l'appendice, ainsi que la mucosité verdâtre du duodénum et du jéjunum, la bile et l'urine d'un de ces lapins nouveau-nés immunisés par hérédité. L'animal a été sacrifié six jours après l'infection buccale que l'on pratiqua au lendemain de sa naissance. Les ensemencements du contenu intestinal de ce petit lapin demeurèrent stériles.

Les échantillons de ces différentes sécrétions recueillies sont ensemencés, chacun, avec une anse de vibrions et portés à l'étuve. Voici les résultats : dans les sécrétions du cæcum et de l'appendice, les vibrions se développent tout de suite et assez bien ; ils y forment bientôt une culture pure. Dans la sécrétion du duodénum, au contraire, on les trouve morts au bout de trois heures; dans le suc de l'intestin grêle, ils meurent entre une et trois heures. Dans la bile ils se développent très peu,

(1) Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. *Arch. für Hygiene*, 1902, **45**, p.146.

comme d'habitude. Dans l'urine (environ 2 cent. cubes), de réaction alcaline, la stérilité est complète au bout d'une heure seulement.

VIII

Pourquoi les cobayes nouveau-nés sont réfractaires au « choléra intestinal ».

On a essayé de reproduire expérimentalement le choléra intestinal des jeunes lapins, chez les jeunes cobayes. Il était donc naturel de chercher à suivre ce qui se passe dans ces essais chez les nouveau-nés du cobaye.

Nous ne trouvons sur ce sujet qu'une courte allusion, dans un mémoire de Metchnikoff (1). Il écrit d'être parvenu à reproduire le processus intestinal chez les cobayes à la mamelle en employant le vibrion de Massaoua, bien connu pour son exceptionnelle toxicité. Les essais pratiqués par mon regretté maître avec le vibrion de Versailles, au contraire, échouèrent. Pourtant, la nature cholérique de ce vibrion, par moi isolé en 1892, dans une fontaine publique à eau de Seine de Versailles, avait été reconnue par Metchnikoff lui-même, dans ses expériences sur l'homme (2).

En vérité, avec le vibrion de Massaoua seul, ainsi que Metchnikoff lui-même le déclare, les essais ne réussirent pas davantage. Il fut obligé d'y associer d'autres microbes favorisants et, malgré cet artifice, les lésions intestinales, même dans les cas suivis de mort, étaient à peine accusées. Chose étrange, l'organe le plus atteint, chez les cobayes à la mamelle infectés de choléra, ce n'était pas le cæcum, ni l'intestin grêle, mais l'estomac! Et les vibrions, on les trouvait partout répandus dans les tissus, quoique avec une plus grande abondance dans le tube digestif. Il s'agissait donc d'une infection générale. Metchnikoff attribue cette différence considérable de résultats au genre spécial de vie des cobayes. Les cobayes nouveau-nés, en effet, commencent à manger de l'herbe dès le premier ou le deuxième jour, ce qui contribuerait, d'après lui,

(1) Recherches sur le choléra, etc. (IVe mémoire). Ces *Annales*, 1894, p. 568.
(2) *Ibidem*, p. 534.

à enrichir très précocement la flore intestinale de ces animaux, de façon à y gêner, dès les premiers jours, la multiplication des vibrions.

De cette façon seulement, d'après Metchnikoff, pourrait s'expliquer le fait, en apparence extraordinaire, que les cobayes nouveau-nés résistent au « choléra intestinal » mieux que les lapins à la mamelle.

Cette discordance, au fond, en examinant les faits de près, n'existe guère. Il faut, avant tout, tenir pour acquit qu'à l'égard du développement organique, ainsi que de la maturité et de la résistance congénitale des tissus, il existe effectivement une notable différence entre les lapins nouveau-nés et les cobayes nouveau-nés!

La gestation des lapines fécondées est de trente jours, alors que celle des femelles de cobayes dure de soixante à soixante-cinq jours. Aussi les petits que ces dernières mettent bas, sont à ce moment beaucoup plus avancés que les petits lapins nouveau-nés dans leur développement et, tout en étant à même de brouter de l'herbe, ils disposent du lait maternel. Tout cela représente pour eux un considérable avantage et signifie que leur système digestif est bien plus développé et, par conséquent, beaucoup plus résistant que le tube digestif des lapins nouveau-nés, qui ne peuvent tolérer, pendant les premiers dix à douze jours, que du lait maternel.

Cette circonstance, à elle seule, permet de comprendre pourquoi les cobayes nouveau-nés ne contractent pas le « choléra intestinal » à l'instar des jeunes lapins, même de plusieurs jours.

Naturellement cette précocité de l'alimentation végétale chez les cobayes engendre à son tour, précocement, dans leur tube digestif, et plus particulièrement au niveau du cæcum, l'apparition d'une flore microbienne très riche et variée, ainsi que Metchnikoff l'a signalé le premier. Elle se compose de staphylocoques, de streptocoques, de B. coli, de sarcines, etc., et, pour les espèces sporogènes, du *mesentericus vulgatus* et du *subtilis*. Le contenu du cæcum, dès les premières vingt-quatre heures, est de couleur verdâtre, à l'aspect fécal et on y retrouve bien d'autres microbes non cultivables : spirilles, coccobactéries, pseudo-vibrions, jusqu'à des organismes ciliés. En somme la même flore fécale que chez les cobayes adultes.

A l'autopsie des cobayes, tués une heure après la naissance, on trouve déjà beaucoup de streptocoques pullulant sur la muqueuse buccale, mais l'intestin est encore stérile, on y décèle seulement quelques B. *mesentericus*. Cette stérilité en microbes non sporulés se maintient pendant les premières six heures de vie. Ce n'est qu'à partir de la douzième heure que la flore buccale des cobayes, constituée par plusieurs espèces de bacilles, de sarcines et de streptocoques particulièrement, fait sa première apparition dans le tube digestif.

Par quel chemin y parvient-elle? La forte acidité du contenu gastrique, mortelle pour les espèces non sporulées, ainsi que la présence précoce signalée plus haut des bactéries sporogènes très résistantes du type *mesentericus*, induisent à penser que c'est par la voie indirecte de la circulation générale que se fait cette propagation. Cette flore microbienne s'installerait ainsi naturellement dans le tube digestif des cobayes nouveau-nés, comme il arrive pour les vibrions administrés expérimentalement par la bouche des lapins à la mamelle, et presque au bout du même laps de temps, douze heures, comme je l'ai signalé avant, au chapitre VI.

L'acidité du contenu gastrique des cobayes nouveau-nés est très élevée et est due particulièrement à l'acide lactique; chez des sujets de seize à dix-huit heures seulement, elle correspond à 1,60, à 1,77 p. 100, à peu près comme chez les lapins nouveau-nés. Pareille acidité est absolument mortelle pour les espèces microbiennes non sporulées, d'après A. Pick (1).

Toutes mes nombreuses tentatives faites pour reproduire le « choléra intestinal » des jeunes lapins chez les cobayes nouveau-nés ont échoué. Je leur ai administré par la bouche des cultures entières de vibrions de l'Isonzo, même après une heure ou deux seulement de vie.

Cette forte résistance des cobayes nouveau-nés ne peut pas être attribuée à des influences humorales. J'ai déjà montré, dans mon deuxième mémoire, que le sérum de cobaye adulte est dépourvu de tout pouvoir vibrionicide. Le même défaut se constate dans le sérum du cobaye nouveau-né.

(1) Ueber die Einwirkung von Wein und Bier, sowie von einigen organischen Saüren auf die Cholera und Typhusbakterien. *Arch. für Hygiene*, 1893, **19**, p. 51.

Chez le seul petit cobaye, d'un lot de onze cobayes infectés si précocement, mort au bout de quinze jours après l'infection buccale, le poids n'avait augmenté que de 5 grammes, étant passé de 70 à 75 grammes. Il était descendu à 55 grammes pendant le premier jour après l'administration des vibrions. Pendant le même laps de temps, les autres petits cobayes infectés présentèrent un arrêt de développement beaucoup moins accusé et les témoins gagnaient presque le double de poids, sans discontinuité.

Cela montre que les vibrions ne sont pas absolument indifférents dans l'arrêt du développement et la mort, quoique très rare, des cobayes nouveau-nés. En les sacrifiant au cours de l'expérience, on ne retrouve pas de vibrions vivants dans leur tube digestif, si ce n'est que l'ébauche d'une gastro-entérite, vraisemblablement toxique, due à l'absorption du protéide apporté par les vibrions ingérés.

CONCLUSIONS

Je crois pouvoir tirer des expériences exposées et analysées dans les pages qui précèdent les conclusions suivantes :

1° Le contenu gastrique des jeunes lapins ne permet pas le transit par le pylore aux espèces microbiennes dépourvues de spores. Les premières espèces qui s'installent dans le tube digestif, chez les lapins nouveau-nés, sont anaérobies et cela seulement au bout de vingt-quatre heures. L'intestin grêle est envahi bien des jours plus tard, mais son contenu en est toujours très pauvre, sauf dans les portions inférieures où le nombre des microbes est légèrement plus élevé. Le duodénum demeure toujours stérile.

2° Le vibrion du choléra administré par la bouche, aux lapins à la mamelle, reproduit le tableau morbide intestinal mortel qui cependant a très peu d'analogie avec celui du vrai choléra de l'homme et ne pourrait pas vraiment être désigné sous le nom de choléra intestinal ou expérimental. Ce processus se reproduit sans le concours de microbes favorisants, jusqu'à ce que, vers le dixième jour de vie, l'orga-

nisme ayant acquis une résistance assez forte, tout essai de contamination demeure sans résultat.

3° Les vibrions introduits dans la cavité buccale du lapin à la mamelle disparaissent rapidement de la muqueuse. L'action bactéricide du lait maternel intervient sans doute aussi dans cette disparition.

4° Chez les jeunes lapins morts de « choléra », même si l'infection leur a été transmise par la voie de la circulation, il se produit une abondante excrétion de vibrions par la muqueuse bucco-pharyngienne.

5° Le contenu gastrique normal des lapins nouveau-nés a une acidité très élevée. Mais, à la différence de ce qui s'observe chez les cobayes adultes et nouveau-nés, l'acidité gastrique des lapins à la mamelle infectés par les vibrions augmente à la suite de l'évolution de la maladie intestinale.

6° La sécrétion gastrique des lapins nouveau-nés, ainsi que celle des lapins adultes, exerce sur les vibrions, comme sur les autres microbes asporogènes, une action bactéricide presque instantanée.

7° En plus des acides lactique et chlorhydrique, prennent part à cette action bactéricide si puissante de la sécrétion gastrique des jeunes lapins quelques éléments résistants à la chaleur qui, à l'égard de leur solubilité dans le chloroforme et l'éther, se comportent comme des acides gras et des corps gras neutres.

8° Dans le « choléra » des jeunes lapins, les organes atteints électivement par les vibrions sont : le cæcum avec son appendice vermiforme et le côlon. L'intestin grêle est toujours moins riche en vibrions, s'il n'est pas entièrement stérile, ce qui est la règle pour le duodénum. Ainsi, non seulement au point de vue bactériologique, mais encore sous le rapport anatomo-pathologique, le processus en question doit être envisagé simplement comme une entérocolite cholériforme, et point du tout comme « choléra intestinal ».

9° Les vibrions introduits dans la bouche du lapin à la mamelle n'atteignent pas les parois intestinales directement en passant par l'estomac ; mais ils y parviennent indirectement, par la circulation générale.

10° On peut réaliser l'entérocolite vibrionienne chez les jeunes lapins même sans introduire les vibrions par la bouche.

En les injectant sous la peau, dans le péritoine ou dans la veine on reproduit chez ces petits animaux absolument le même tableau.

11° Les vibrions administrés par la bouche aux jeunes lapins sont, d'abord, absorbés par les voies lymphatiques ; ils passent ensuite de là, par les grands troncs lymphatiques, dans la circulation générale. Leur première apparition dans le canal digérant se produit vers la douzième heure et au niveau de l'iléum, du cæcum, de l'appendice et du côlon. Plus tard ils remontent, en petite quantité, le long de l'intestin grêle, sans jamais atteindre la portion duodénale.

12° Les premières manifestations morbides se vérifient à partir de vingt-quatre heures et n'intéressent particulièrement que le cæcum et le côlon. Les petits lapins ne cessent de gagner du poids jusqu'à la veille de la mort.

13° L'intervention d'autres microbes, comme le B. coli, augmente la gravité du processus intestinal et le déclenche même alors qu'il atteint cette maturité de développement qui le rend ordinairement réfractaire à l'entérocolite vibrionienne.

14° Cette résistance intestinale débute seulement vers le dixième jour de vie et coïncide avec la première apparition, dans le plasma sanguin, de substance vibrionicide (alexine).

15° Avant cette période, le sérum sanguin des lapins nouveau-nés se montre très pauvre en alexine et cela explique les insuccès des nombreuses tentatives faites pour vacciner ou pour immuniser passivement, par le sérum, les lapins nouveau-nés.

16° L'apparition des anticorps spécifiques dans le sang des lapins nouveau-nés ne peut s'obtenir que par la vaccination des mères, pendant la gestation. Les lapins nés de ces mères inoculées sont réfractaires même à l'entérocolite cholérique. Les vibrions administrés par la bouche peuvent atteindre néanmoins, en petit nombre, la muqueuse des derniers segments du tube digestif, d'où il viennent expulsés avec les fèces.

17° La résistance à l'entérocolite vibrionienne opposée par les petits lapins plus âgés est due principalement à une moindre perméabilité, pour les vibrions, de leur muqueuse buccale et à une sensibilité plus atténuée de la muqueuse intestinale par où se fait leur excrétion.

18° Celle-ci est encore la raison qui fait que les cobayes, même ceux qui viennent de naître, ne tombent jamais malades de « choléra intestinal ». Les cobayes venant à la vie, après une longue gestation de soixante jours au moins, sont pourvus, dès le début, d'organes de digestion beaucoup plus développés que ceux des lapins qui naissent après une gestation de trente jours seulement. Chez les premiers donc non seulement la perméabilité pour les vibrions est bien limitée à la muqueuse bucco-pharyngienne, mais la résistance de la muqueuse excrétrice intestinale est beaucoup plus forte que chez les lapins nouveau-nés.

19° L'acidité gastrique des cobayes nouveau-nés ne permet pas le transit jusqu'à l'intestin, aux vibrions, ni aux autres microbes non sporogènes administrés *per os*. Mais les matières protéides bactériennes qui passent à travers l'estomac peuvent être absorbées par la jeune muqueuse intestinale et produire par la voie indirecte, de la circulation générale, à revers, une gastro-entérite d'élimination toxique.

20° Les vibrions administrés par la bouche aux cobayes nouveau-nés peuvent, cependant, ne fût-ce qu'en petite proportion, être absorbés par les vaisseaux lymphatiques de la cavité buccale et éliminés dans la suite comme d'habitude, par les derniers segments du tube digestif.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DIAGNOSTIC DE L'INFECTION TUBERCULEUSE

par W. FORNET.

Widal et Lesourd, Camus et Pagniez en 1901, puis Wassermann et Bruck, Calmette, L. Massol et M. Breton en 1908, puis Besredka et de nombreux autres expérimentateurs nous ont appris à utiliser la méthode de la déviation du complément de Bordet-Gengou dans le diagnostic de la tuberculose et les résultats obtenus d'après ce procédé ont été satisfaisants. Mais les autres procédés tels que, l'agglutination et la précipitation ne sont pas encore entrés dans la pratique de ce diagnostic.

L'emploi de l'agglutination est rendu particulièrement difficile parce que l'enveloppe ciro-graisseuse, à laquelle les bacilles doivent leur acido-résistance, les empêche d'être facilement émulsionnés dans l'eau physiologique comme les autres microbes dont l'agglutination nous est devenue un moyen précieux de diagnostic de la maladie correspondante. Cette même enveloppe ciro-graisseuse entrave l'échange de fluides entre le plasma spécifique du bacille tuberculeux d'une part, et les tissus de l'organisme infecté par lui d'autre part. C'est peut-être la raison pour laquelle l'organisme ne réagit que très difficilement par l'élaboration d'anticorps spécifiques contre le bacille tuberculeux et pour laquelle aussi les anticorps produits quand même par l'organisme ne peuvent pas pénétrer jusqu'au plasma spécifique du bacille tuberculeux.

Enfin c'est encore à leur enveloppe ciro-graisseuse que les bacilles doivent de se développer avec une grande lenteur.

Or il est possible de libérer les bacilles de leur paroi si difficilement perméable sans, pour cela, les tuer. Alors ils ne sont plus acido-résistants, ils s'émulsionnent avec la plus grande facilité et on peut, en les injectant aux animaux, provoquer la formation d'agglutinines et de précipitines spéci-

fiques. Enfin on peut se servir de ces « bacilles nus » pour immuniser les animaux comme s'il s'agissait d'autres microbes pathogènes.

Il existe déjà plusieurs méthodes pour priver le bacille tuberculeux de son enveloppe encombrante. Elles ont toutes ce trait commun de dissoudre ses graisses. Tantôt on s'adressait à des ferments sous l'influence desquels Marino, par exemple, voyait disparaître l'acido-résistance des bacilles tuberculeux dans la cavité centrale de la sangsue; tantôt on utilisait la bile, la lécithine ou le jaune d'œufs qui, dans les mains de Calmette et C. Guérin, émulsionnaient les graisses de l'enveloppe tuberculeuse. Tantôt enfin c'était, comme dans les expériences de Ferrán et d'Auclair, le mode de culture en milieu pauvre qui tendait à rendre impossible la formation de l'enveloppe ciro-graisseuse.

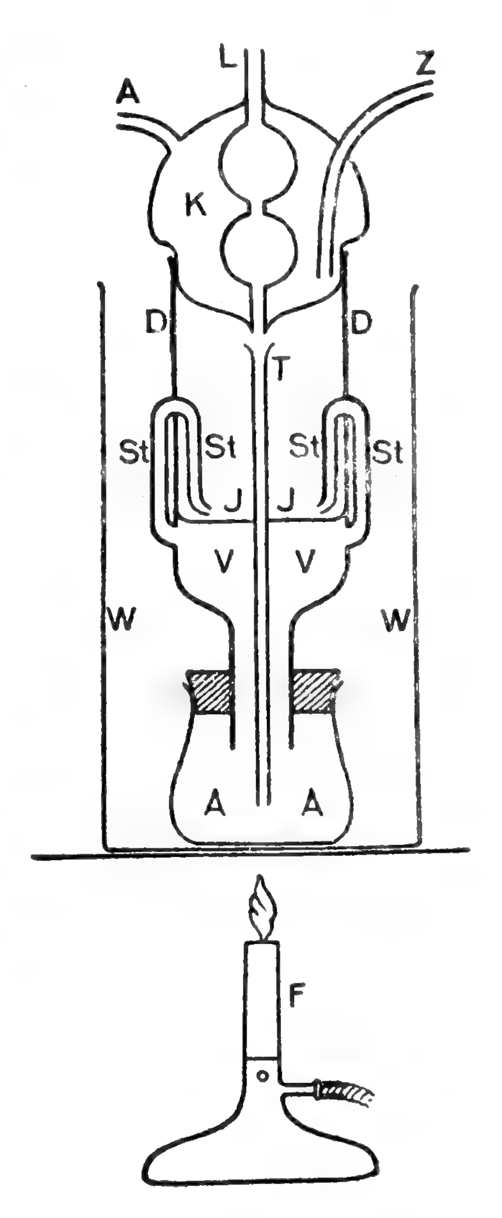
Et tous ceux qui, comme Ferrán, Arloing, Behring et Romberg, Koch, Maragliano et tant d'autres, ont voulu utiliser l'agglutination de bacilles tuberculeux pour le diagnostic de la tuberculose, se sont efforcés d'éliminer l'enveloppe ciro-graisseuse. Ou bien ils partaient de cultures homogènes comme Ferrán et Arloing, ou bien ils tâchaient de saponifier les graisses à l'aide d'alcali comme faisaient Behring et Romberg; ou enfin, comme Koch, ils cherchaient à détruire cette enveloppe par des procédés mécaniques. Tous ces procédés ont l'inconvénient, ou de ne pas être assez efficaces parce qu'ils laissent intacte une grande partie de l'enveloppe ciro-graisseuse, ou d'être trop brutaux en attaquant, en même temps que l'enveloppe, le plasma spécifique du bacille tuberculeux.

Ainsi s'explique le fait que les préparations recommandées jusqu'ici pour l'agglutination tuberculeuse ne se sont pas montrées assez constantes et que cette méthode si simple de l'agglutination n'a pas pu s'introduire encore dans la pratique du diagnostic de la tuberculose.

Cherchant une substance qui serait capable de dissoudre l'enveloppe du bacille tuberculeux sans attaquer toutefois son plasma protéique, nous avons trouvé dans les vapeurs d'éther un réactif qui répond à toutes les exigences. Ayant constaté auparavant que les vapeurs d'éther sulfurique possèdent une action microbicide cent fois supérieure à celle de l'éther

liquide, nous nous sommes demandé s'il n'en serait pas de même de son action chimique. L'expérience nous a confirmé pleinement dans cette supposition.

En traitant une culture de bacilles tuberculeux pendant six à huit heures par des vapeurs d'éther à 40° dans l'appareil décrit ci-dessous, il se dégage des bacilles tuberculeux une épaisse couche graisseuse. Les bacilles ainsi dégraissés qui se trouvent en dessous de cette couche n'ont rien perdu de leur spécificité. Ils sont fortement agglutinés par le sérum des malades tuberculeux. Injectés aux animaux, ils sont capables d'influencer notablement le cours de l'infection tuberculeuse et de produire des sensibilisatrices antituberculeuses.



L'appareil dont nous nous servons dans l'éthérisation des bacilles tuberculeux se compose de trois parties : du matras A contenant l'éther liquide, du récipient D contenant l'émulsion de bacilles et du condenseur K. Ces trois parties construites en verre sont jointes l'une à l'autre à l'émeri et se trouvent dans un bain-marie à 40°. Les vapeurs d'éther développées dans le matras A montent par les tuyaux St dans la chambre J et y mettent l'émulsion de bacilles dans une très forte ébullition permanente. En montant alors, les vapeurs d'éther sont condensées à la surface de K; de là l'éther liquide rejoint le matras A par l'entonnoir T pour recommencer de là sa circulation automatique.

En nous servant d'une émulsion de ces bacilles dégraissés nous avons examiné jusqu'ici le sérum de 176 sujets. 93 p. 100 des tuberculeux montraient une agglutination positive à 1 : 60 et plus, jusqu'à 1 : 800 tandis que, chez 95 p. 100 des non-tuberculeux, l'agglutination restait négative. Pour être bien sûrs de l'utilité de notre réactif bacillaire agglutinable

il faudra qu'il ait été employé sur le sérum de plusieurs milliers de tuberculeux. Mais dès aujourd'hui nous pouvons affirmer qu'une agglutination positive obtenue avec notre réactif bacillaire rend l'existence d'une tuberculose vraisemblable, tandis que l'agglutination négative plaide contre ce diagnostic. Un changement du taux d'agglutination parlerait en faveur de l'activité d'un processus tuberculeux.

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET PROPHYLACTIQUES DU PALUDISME

(**Dix-septième, dix-huitième et dix-neuvième campagnes en Algérie, en 1918, 1919 et 1920.**) (1)

par Edmond SERGENT et Etienne SERGENT
(Institut Pasteur d'Algérie).

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

La violence et l'extension du paludisme ont été, en **1918**, presque aussi considérables en Algérie qu'en 1916 et 1917. Certaines régions sont redevenues malsaines ; la mortalité par paludisme a encore été forte.

En **1919**, le paludisme a été sévère en de nombreuses localités des trois départements. Au contraire, en **1920**, les fièvres ont été, *en général*, moins répandues et moins graves, malgré quelques recrudescences très violentes en certains points isolés.

I. — Gîtes à Anophélines.

Pluies. — La formule : « printemps pluvieux, été fiévreux » s'est confirmée en **1918**. Des pluies très abondantes et générales à toute l'Algérie se sont produites du 7 au 10 juin 1918. La cuvette du lac Halloula, à la date du 10 juin, est submergée sur une étendue de 88 hectares. D'autre part, ces pluies ayant amené un rafraîchissement de l'atmosphère, le début de l'épidémie subit un léger retard : fin juillet seulement.

En automne les pluies torrentielles précoces du 1er au 6 octobre ont formé de nouveaux gîtes avant la fin de la chaleur. Elles ont ainsi créé de nouvelles chances d'infection de pre-

(1) Campagnes dirigées pour le compte du gouvernement général de l'Algérie. Pour les campagnes précédentes, voir ces *Annales* et *Atti della Societa per gli Studi della Malaria*, Roma.

mière invasion : d'autre part, par refroidissement humide de l'atmosphère, elles ont provoqué de nombreuses rechutes chez les anciens infectés.

En 1919, le printemps a été pluvieux. Le 1[er] juin, 120 hectares de la cuvette du lac Halloula étaient encore sous l'eau.

En 1920, hiver très peu pluvieux, printemps sans pluie, sécheresse persistante : diminution de l'étendue et de la durée des gîtes à Anophélines en général, d'où diminution remarquable de l'endémie palustre.

Effet paradoxal de la sécheresse sur l'endémie palustre. — L'oued Rummel, avant de s'engager dans le ravin très étroit qui entoure la ville de Constantine, s'étale sur un lit de gravier et de gros cailloux roulés, au bas du faubourg Bellevue. En 1920, année de sécheresse persistante, le courant de l'oued étant moins fort, les mares formées dans le lit graveleux de l'oued ont été plus nombreuses, les Anophèles plus nombreux et la zone de l'endémie palustre qui dépend de ce foyer a été considérablement augmentée.

Influence des chaleurs tardives. — En septembre 1918, du 17 au 22, on nota une longue période de sirocco intense (5 jours 1/2).

En 1919, l'été s'est prolongé très tard.

Comme nous l'avons déjà vu en 1904, ces longues périodes de grande chaleur sont favorables au paludisme, parce qu'elles fournissent aux *Plasmodium* la température qui leur est nécessaire pour évoluer dans le corps des moustiques. D'après les expériences de laboratoire, la température minima nécessaire est + 16°. Mais dans la nature, sur les Hauts-Plateaux et dans les montagnes algériennes, le refroidissement nocturne compromet souvent l'évolution du parasite chez l'insecte. Tandis que le sirocco qui souffle nuit et jour éprouve les hauteurs encore plus que les vallées et les bas-fonds.

Remuements de terre. — Nouvel exemple de l'innocuité complète du « remuement de terre », accusé par un vieux préjugé d'être la cause efficiente du paludisme : les travaux d'assèchement du lac de Telamine, entre Arzew et Oran, ont été effectués en 1918 au moyen de la main-d'œuvre pénitentiaire militaire

Un grand drain à ciel ouvert a été creusé sur plusieurs kilomètres de longueur; le nombre de mètres cubes de terre humide remuée a été considérable. Néanmoins il n'y a pas eu de paludisme dans le chantier, ni dans les fermes environnantes.

D'importants travaux de terrassements eurent lieu au jardin d'Essai (près d'Alger) en 1918 et 1919. Quelques cas de paludisme de première invasion se produisirent dans le quartier : Le remuement de terre n'a été qu'une coïncidence, la cause efficiente a été la suivante : d'une part, apport de virus sous forme d'une cinquantaine de travailleurs russes déjà paludéens (2 grosses rates sur 30) et d'une troupe de travailleurs indigènes; d'autre part, création de gîtes à Anophélines (*A. maculipennis*, *A. bifurcatus var. algeriensis*) : bassins de grandes dimensions, non pétrolés, et garnis de plantes aquatiques variées.

Marécages sans paludisme. — Qui dit marécage ne dit pas forcément localité palustre ; des marais ne sont pas nécessairement des gîtes à Anophélines : le marais de Telamine, qui n'engendrait pas les fièvres, contenait de l'eau salée, impropre à la pullulation des larves d'Anophélines.

Lentilles d'eau (Lemna) et larves d'Anophélines. — La recherche des larves de moustiques a été faite, systématiquement, pendant les années 1918 et 1919, dans toutes les collections d'eau contenant des lentilles d'eau. Toujours, pendant la saison chaude, on y a trouvé des larves d'Anophèles (ou de *Culex fatigans*, commensales ordinaires des larves d'Anophèles).

Anophélisme sans paludisme, conséquence de l'absence de réservoir de virus. — Ferme P... (Corso) [observation du Dr Ettighoffer].

Un camp de 18 travailleurs russes est établi pendant l'automne 1918 dans la vallée réputée très fiévreuse du Corso, à 100 mètres de l'oued. La quininisation préventive ordonnée par l'autorité militaire n'y est pas faite. Ces 18 Russes paraissent donc très exposés au paludisme. Pourtant ils sont restés complètement indemnes. Ce fait s'explique par l'isolement complet du camp dans une zone de 1.500 mètres de rayon au

moins. Les indigènes qui travaillent au camp retournent le soir à leurs gourbis distants de plus de 1.500 mètres. Aucun paludéen — réservoir de virus — n'existe donc aux abords du camp. On sait que le vol des Anophélines, dans la Mitidja, n'excède pas 1.500 ou 2.000 mètres. Les Anophèles de la ferme P., quoique nombreux, ont été inoffensifs, parce qu'ils n'ont pas eu de virus à transporter.

Cas ou la mise en culture du sol augmente le paludisme. — Dans une des parties les plus marécageuses de la plaine de Maison-Carrée, des surfaces d'eau stagnantes, reliquat des pluies d'hiver, subsistaient d'habitude jusqu'au mois de juillet. Arrive l'agriculteur qui, pour rendre la terre cultivable, creuse de profonds drains à ciel ouvert qui assèchent la surface du sol et permettent la culture de la vigne. Mais le fond des drains reste tout l'été plein d'eau presque stagnante, la pente générale du terrain étant très faible. Ces drains constituent donc des gîtes constants à Anophélines, beaucoup plus dangereux par conséquent, quoique de dimensions plus restreintes, que les mares temporaires d'autrefois. Dans ce cas particulier, la culture, au lieu d'assainir la région, a augmenté les risques d'infection palustre.

Chauves-souris et paludisme. — Deux localités algériennes où les chauves-souris sont très nombreuses : Rivet (département d'Alger) et Hammam-Meskhoutine (département de Constantine) ont été étudiées au point de vue de l'influence des Cheiroptères sur l'endémie palustre. Ces animaux se nourrissent en effet d'un nombre considérable d'insectes ailés, parmi lesquels les Anophélines.

En ce qui concerne Rivet, les alentours de la grotte où vivent les chauves-souris sont manifestement plus sains que les autres localités de la région ; mais ce fait peut s'expliquer par les conditions topographiques : (région montagneuse, à plusieurs centaines de mètres au-dessus de la plaine ; pentes rapides favorisant l'écoulement des eaux).

A Hammam-Meskhoutine, les environs de la grotte à chauves-souris ne sont pas moins malsains que les localités voisines : l'index endémique y est aussi élevé.

On ne peut donc pas conclure que, dans ces deux localités algériennes, les chauves-souris remplissent un rôle protecteur contre le paludisme.

La longueur du vol des Anophélines peut se restreindre a quelques dizaines de mètres aux abords immédiats des villes. — Les Anophélines nés d'un oued qui longe une ville trouvent à proximité la nourriture sanguine qui leur est nécessaire et ne s'éloignent que très peu de leur lieu d'éclosion. On voit dans les villes algériennes le paludisme se cantonner à un seul quartier, parfois à une seule rangée de maisons, alors que dans les campagnes la zone d'invasion des Anophélines s'étend, en général, à 1.500 ou 2.000 mètres, et exceptionnellement (plaine de la Seybouse), à plusieurs kilomètres. Exemples de faible extension du vol des Anophélines : ville de Guelma, le quartier nord-ouest, longé par l'oued Skhoun, est le quartier paludéen. Orléansville : le quartier paludéen est à l'ouest, où coule un affluent du Chéliff; dans le quartier est, pas de paludisme (observation du Dr Lapin).

Ces observations faites en 1918 confirment celles qui ont été faites dans ce sens, il y a plusieurs années, à Djidjelli, à Oued-el-Alleug, à Boufarik, à Arzew.

Hauteur du vol des Anophélines. — Jusqu'à présent, la plus grande hauteur du vol des Anophélines, constatée en Algérie, avait été de 112 mètres. Nous avons vu, en 1920, que cette hauteur peut atteindre 185 mètres, en ce qui concerne le *Pyretophorus myzomyifacies*, insecte qui vit d'habitude dans les ravins profonds des régions montagneuses. Aux mines de fer de Lallia-Filfila (près de Philippeville), les *Pyretophorus* montent de l'Oued-Rhira, profondément encaissé, jusqu'aux habitations des mineurs, s'élevant ainsi à une hauteur de 185 mètres au-dessus du cours d'eau où ils ont pris naissance.

Transport des Anophélines par les véhicules. — On observe couramment le transport des Anophélines, souvent en grand nombre, par les trains. Ce fait est particulièrement net en automne à Mondovi. Dans ce bourg, la campagne antilarvaire, très active, supprime presque totalement les Anophélines

pendant la saison chaude, jusqu'au mois d'octobre. A ce moment, presque chaque année, des Anophélines apparaissent (parfois en grand nombre) à Mondovi. On les voit *toujours* apparaître d'abord à la gare, et ils restent localisés dans les quartiers voisins. Or il est facile de voir ces insectes sortir des wagons, à l'arrivée du train du soir (vers 17 h. 30) en novembre et décembre; le train vient de s'arrêter aux gares précédentes de Saint-Paul, Oued-Sba, où les Anophélines pullulent et envahissent les wagons à la nuit tombante.

Importance de l'observation de la date des premières pontes des Anophélines. — Il est très important de connaître la date des premières pontes des Anophélines dans une région donnée, pour organiser une campagne antipaludique; la connaissance de cette date fournit à l'hygiéniste une indication précise pour la fixation du moment où la destruction des gîtes à Anophélines doit être complète. Exemple : on dira que telle localité de la Mitidja ne pourra être assainie complètement que si ces gîtes à Anophélines sont détruits (ou rendus inoffensifs) dès la fin du mois d'avril. Dans la région de Batna, au contraire, à plus de 1.000 mètres d'altitude, cette date pourra être reculée d'un mois et demi ou deux.

Anophélines exposés au froid. — Un *Anopheles maculipennis*, ayant sucé du sang, est placé à la température de + 12°. Il y pond et des larves éclosent normalement.

Des œufs d'*Anopheles maculipennis* sont placés, aussitôt après la ponte, à la température de — 10° pendant cinq mois consécutifs. Au bout de ces cinq mois, ils sont placés à la température de + 22°. Aucun n'éclôt.

Variété de Pyretophorus myzomyifacies. — Cette variété, déjà signalée dans le Sud constantinois, dans le Sud oranais et dans le Tell, a été retrouvée près de Maison-Blanche (Mitidja), à proximité de l'Oued-Hamiz. Elle présente des particularités dans les nervures de l'aile; la tache située à la base de la fourche de la première nervure longitudinale est beaucoup plus petite que les taches correspondantes de la costale et de la sous-costale et se trouve au niveau de l'extrémité apicale de ces taches de la costale et de la sous-costale.

II. — Réservoir de virus.

Envahissement des villages et des villes par les indigènes. Danger des migrateurs. — Un véritable danger du point de vue du paludisme est constitué par l'invasion progressive des villages et des villes de l'intérieur par la population indigène. Depuis la guerre surtout, pendant laquelle la population française des campagnes a diminué, les indigènes se sont installés dans les petits centres, apportant un virus nouveau.

Les migrateurs venant du Sud s'établissent dans certains villages pendant la saison chaude; dans maint endroit leur présence a déterminé de petites épidémies locales.

Ce virus indigène est bien plus dangereux que le virus serbe ou macédonien auquel on a attribué à tort la recrudescence violente du paludisme de 1915, 1916 et 1917. Car ces indigènes ont un virus qui n'est jamais quininisé, tandis que les « retours d'Orient » sont tous plus ou moins quininisés.

Paludisme des hauteurs. — Dans un village situé dans la montagne (au-dessus d'El-Alef, département d'Oran), le paludisme est d'ordinaire inconnu : en 1917 (printemps très humide), mortalité très élevée, beaucoup plus que dans la plaine. Les habitants des montagnes sont plus malades que les habitants des plaines, quand survient une épidémie de paludisme. Ils n'ont pas « l'immunité relative » conférée par de fréquentes infections antérieures.

Hygiène générale et paludisme. — Le *remède du paludisme est dans la marmite* (Proverbe toscan) ; c'est-à-dire la misère et le manque d'hygiène favorisent l'infection paludéenne. Ce proverbe trouve sa confirmation dans la région de Baba-Ali (Mitidja). Cette région comprend deux parties :

1° La tribu située près des gîtes (emprunts de la voie du P.-L.-M., région basse et marécageuse) et 2° le domaine de Baba-Ali et les fermes voisines, situés plus loin des gîtes. Or, la population indigène montre un index endémique de 34,4 p. 100 pour la tribu qui est plus exposée, et de 78 p. 100 pour le domaine et les fermes qui sont pourtant moins exposés. L'explication de ce fait paradoxal est la suivante : les indigènes

logés près des fermes et dans le domaine sont des ouvriers miséreux, tandis que les gens de la tribu sont des locataires ou des indigènes assez fortunés. Ils se nourrissent mieux en général et résistent davantage au paludisme.

L'INDEX ENDÉMIQUE DONNÉ PAR LA PROPORTION DES GROSSES RATES DANS UNE LOCALITÉ DEVENUE PALUDÉENNE DEPUIS PEU, EST PLUS ÉLEVÉ CHEZ LES ADULTES QUE CHEZ LES ENFANTS. — Observation confirmée,une fois de plus, en 1918, dans la région du Retour-de la-Chasse, où le paludisme a reparu depuis deux ans environ seulement, par suite de l'engorgement des canaux d'assèchement. Le rapport des rates hypertrophiées chez les adultes et chez les enfants est égal à 3/2.

FIÈVRE BILIEUSE HÉMOGLOBINURIQUE. — En 1918, 4 cas dans la région de Batna (guérison sans quinine, Dr Mondelin); 2 cas à Mac-Mahon (guérison par la poudre de quinquina, Dr Parrot); 1 cas à Bouïra (chez une ancienne infectée, accès survenant quelques heures après l'absorption de 60 centigrammes de quinine; quininisation irrégulière auparavant (Dr Prunier).

En 1919, 1 cas suivi de mort à Mac-Mahon (Dr Parrot).

En 1920, 1 cas à Touggourt (Dr Drouet); 1 cas à Morris (Dr Grücker) (cas mortel chez une ancienne paludéenne enceinte).

QUARTE. — Toujours rare. En 1918, 2 cas vérifiés au microscope à Maison-Carrée; plusieurs cas signalés à Nédroma (département d'Oran). En 1919, 1 cas à Mac-Mahon (département de Constantine); 1 cas à Aïn-Taya (département d'Alger).

ÉTUDES PROPHYLACTIQUES

1° Les conditions créées par la guerre ont en 1918-1919-1920 augmenté encore les difficultés de la lutte antipaludique.

Le service de la quininisation a dû être suspendu complètement en plusieurs localités, les agents quininisateurs étant aux armées (deux d'entre eux, mobilisés, ont été remplacés par leur femme). Le renchérissement excessif de la main-d'œuvre et du matériel, la pénurie complète de pétrole pendant

certaines périodes de l'année 1918 ont gêné considérablement l'exécution des mesures d'assainissement. Les crédits mis à la disposition du Service antipaludique étant restés les mêmes, certains chantiers antilarvaires ont dû suspendre leurs opérations en pleine saison fiévreuse. Les médecins collaborateurs, surmenés, ne purent pas toujours surveiller étroitement leurs campagnes antipaludiques.

Mais dans les localités où les crédits ont permis d'effectuer les mesures le plus complètement possible, le résultat a été excellent.

La lutte antipaludique a été poursuivie dans les nombreuses localités des trois départements où elle avait été déjà commencée les années précédentes. De plus, onze nouvelles campagnes ont été organisées en 1918, et une nouvelle en 1919. Le nombre des médecins collaborateurs a été de 20 en 1918, de 24 en 1919, de 20 en 1920.

2° La quininisation préventive et curative de plus de 3.000 indigènes a été faite à domicile par des agents spéciaux, rétribués presque tous par le Service antipaludique : en 1918, 24 agents dont 8 femmes; en 1919, 26 agents dont 6 femmes (parmi ces 26 agents, 4 sont rétribués par l'Administration dont ils font partie ou par les propriétaires des domaines à défendre); en 1920, 22 agents, dont 2 mutilés de guerre, et 5 femmes (parmi ces 22 agents, 3 sont rétribués par les communes ou par les propriétaires des domaines à défendre).

Une vingtaine d'institutrices et d'instituteurs en 1918 et 1919, une quinzaine en 1920, ont quininisé leurs élèves à l'école pendant les mois de mai, juin, octobre et novembre.

Doses de la quinine employée préventivement : 40 centigrammes de chlorhydrate de quinine par adulte et par jour, quotidiennement partout où cela est possible. Ailleurs, selon les localités et les possibilités, tous les deux jours ou tous les trois jours : dans ce dernier cas, 60 centigrammes par jour. Doses proportionnelles pour les enfants.

Durée de la quininisation :

Dans le Tell, du 1er mai au 30 novembre, en général. Toute l'année au domaine de l'Habra (département d'Oran).

Le Service antipaludique emploie la quinine sous forme de

dragées contenant 20 centigrammes de chlorhydrate chacune pour les grandes personnes et les enfants à partir de 3 ans, et sous forme de *chocolatines* contenant 45 milligrammes de chlorhydrate chacune pour les enfants en bas âge.

Chlorhydrate de quinine distribué :

1° Dragées.	En 1918,	112 kilogr.	en 281	kilogr. de dragées	= 562.000	dragées.
	1919,	82 —	206	—	= 412.000	—
	1920,	95 —	239	—	= 478.000	—
2° Chocolatines.	En 1918,	1 kil. 977	en 129	kil. chocolat.	= 44.933	chocolatines
	1919,	1 kil. 290	en 85	—	= 28.622	—
	1920,	1 kil. 560	en 104	—	= 34.600	—

3° Les « petites mesures antilarvaires » ont consisté en désherbements, faucardages, régularisation des berges des oueds, assèchements de mares, épandage alternatif des eaux de sources ou de fontaines, pétrolages, sur 20 ou 30 kilomètres (selon les années) d'oueds, canaux, et bords de marécages à Montebello, Tablat, Brazza (Alger); au domaine de l'Habra, à Tourville, Sainte-Léonie et Arlal (Oran); à Mondovi, Penthièvre et Robertville (Constantine). En 1920, faute de crédits, on a été obligé de suspendre l'exécution de ces mesures à Arlal et Penthièvre; les habitants ont réclamé la reprise de la campagne pour l'année 1921.

Défense contre les moustiques adultes. — Roubaud a insisté sur l'utilité des animaux domestiques comme écran protecteur contre les Anophèles.

Comme le rapporte Roubaud, nous avions, dès 1903, signalé la préférence marquée des Anophèles de Vendée pour le porc, relativement à l'homme. Nous avons constaté la même prédilection au Maroc (Kenitra).

En Algérie, notre technique pour la recherche et la destruction des Anophèles adultes consiste en premier lieu dans la visite des écuries et étables : c'est là que nous les avons toujours trouvés en plus grand nombre. (Voir nos rapports, *passim*.) Dans une maison forestière isolée (pic de Mouzaïa), nous avons vu en 1904 un cheval littéralement couvert de piqûres d'Anophèles en une nuit, mais nos moustiquaires ont été aussi furieusement assaillies, sans succès d'ailleurs, par les Anophèles. C'est que dans l'Afrique du Nord, en général, ceux-ci

sont trop ! Beaucoup de piqûres se perdent heureusement sur les animaux domestiques, mais il y a tant d'Anophèles que le bénéfice n'est pas suffisant. Il n'est guère besoin de conseiller à un colon ou à un indigène de grouper ses écuries et étables autour de sa maison comme un écran contre l'Anophèle, il le fait déjà pour mieux les garder contre les voleurs. Dans les fermes du bled algérien, l'élevage du porc est difficile à cause de la répugnance des Mulsulmans pour cet animal impur.

4° Défense mécanique. — Malgré le prix élevé du treillis métallique, les Compagnies de chemins de fer ont entretenu les grillages apposés aux ouvertures des habitations de leurs agents.

5° Propagande. — Distributions de tracts, brochures, visites aux écoles, conférences aux élèves Instituteurs et Institutrices.

I. — CAMPAGNES ANTIPALUDIQUES

Résumé des campagnes de 1918, 1919 et 1920.

1° Département d'Alger.

Quininisation et petites mesures antilarvaires. — *Montebello.* Les petites mesures antilarvaires ont consisté surtout dans l'alternance de l'écoulement des eaux; la quininisation a été faite dans le milieu indigène et chez les élèves de l'école française. C'est à Montebello, hameau placé près d'une vaste dépression (le lac Halloula), que l'effort est donné depuis le plus long temps; après neuf ans de succès de la lutte antipaludique, les conditions créées par la guerre furent cause de la réapparition du paludisme, mais en 1918, 1919 et 1920 la lutte reprise énergiquement permit d'arriver au résultat suivant : pas un seul cas de paludisme de première invasion contracté à Montebello, pendant ces trois années. Tous les nouveau-nés sont restés indemnes.

Tablat, Brazza, Surcouf, Suffren.

Quininisation. — *Attatba, Baba-Ali* (domaine et tribu) (nouvelle campagne), *Birtouta* (abords de la gare); *Beni-Messous* (tribu voisine de Chéragas); *Domaine d'Haouch Hamida*, à

Maison-Carrée (nouvelle campagne); ferme *du Corso* (nouvelle campagne); région de l'*Oued Bacora*, à Fort-de-l'Eau (nouvelle campagne); *Oued-el-Alleug* (quartier nord); *Saint-Cyprien-des-Attafs* (abords de l'hôpital Sainte-Elisabeth); *Oued-Smar* (nouvelle campagne).

2° Département de Constantine.

QUININISATION ET MESURES ANTILARVAIRES. — *Mondovi*, *Penthièvre* ; *Robertville*.

QUININISATION. — *Guelma* (quartier del'Oued-Skhoun) (nouvelle campagne); *Jemmapes* (quininisation aux écoles); à *Biskra* (quininisation dans l'oasis).

3° Département d'Oran.

QUININISATION ET MESURES ANTILARVAIRES. — *Tourville*, *Sainte-Léonie*, *Arlal*. Dans ces trois villages choisis parmi ceux qui étaient autrefois les plus fiévreux, le paludisme a nettement régressé. Les cas de première invasion sont devenus très rares. On apprécie la situation si on la compare à celle des mêmes localités, les années précédentes, ou bien si on la compare à l'état sanitaire contemporain (1918-1920) de régions voisines, non protégées, et qui servent de témoins.

QUININISATION. — Domaines de *l'Habra*, *Clinchant*.

II. — ENQUÊTES

Les demandes d'enquêtes ou d'organisation de campagnes antipaludiques reçues par le Service antipaludique ont été, en *1918*, au nombre de 35, dont 16 pour le département d'Alger, 6 pour le département de Constantine et 13 pour le département d'Oran, 9 par des municipalités, 7 par des médecins, 1 par un syndicat d'agriculteurs, 3 par des instituteurs; 15 par des particuliers.

En *1919*, 20 demandes d'enquêtes, dont 9 pour des localités du département d'Alger, 6 pour le département de Constantine, 4 pour celui d'Oran; 7 par l'Administration supérieure (dont

1 au sujet d'un futur centre de colonisation, 1 au sujet d'un futur sanatorium de tuberculeux, et 1 au sujet d'une future école ménagère agricole); 2 par des municipalités; 2 par des médecins; 9 par des particuliers. 6 pétitions, dont 5 provenant de municipalités, en vue d'obtenir une augmentation de crédit pour la lutte antipaludique, ou une continuation de la campagne contre les fièvres.

En *1920*, 26 demandes d'enquêtes ou de nouvelles campagnes antipaludiques à organiser : 8 du département d'Alger, 4 du département d'Oran, 14 du département de Constantine, (dont 4 par l'Administration supérieure); 5 par des municipalités; 4 par des médecins; 4 par des instituteurs; 9 par des particuliers.

Le Service antipaludique a été appelé à faire étendre à l'armée de l'Afrique du Nord les méthodes qu'il a mises au point. La quininisation préventive des troupes régulières, de la main-d'œuvre russe et des détenus militaires placés dans les localités malsaines a été surveillée et contrôlée en 1918, sous la direction du Service antipaludique par 3 médecins mobilisés (Dr Lapin, Dr Battarel, Dr Vittenet), et continuée en 1919 et en 1920 par un médecin militaire (médecin-major Ballet). Cette campagne antipaludique dans l'armée de l'Afrique du Nord a montré une fois de plus que les méthodes élaborées donnent, en milieu militaire, de remarquables et très rapides résultats.

A la demande du maréchal Lyautey, nous avons organisé en 1919 le Service antipaludique marocain à la tête duquel a été placé un des collaborateurs de l'Institut Pasteur, le médecin-major Vialatte.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

T. XXXV. — 1921. Décembre — N° 12.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE M. PASTEUR

PAR

E. DUCLAUX



PARIS

MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

SECRÉTAIRE DE LA RÉDACTION : CAMILLE RAVEAU
BIBLIOTHÉCAIRE DE L'INSTITUT PASTEUR
25, RUE DUTOT — PARIS (XV)

Les annonces sont reçues à l'Économat de l'Institut Pasteur.

PRIX DE L'ABONNEMENT. — FRANCE : **45 francs**; UNION POSTALE : **55 francs**. PRIX D'UN NUMÉRO : **4 francs**.

SOMMAIRE DU N° 12

Pag

ABONNEMENT. — PRIX DES VOLUMES DES « ANNALES »

Prix de l'abonnement, à partir de 1921. . . . . . . France . . . . **45** fr.
— — — — . . . . . . Union Postale. **55** fr.
Prix du numéro, — — . . . . **4** fr.

Années antérieures. — Les années 1888, 1889, 1890, 1891, 1894 à 1896 sont épuisées.
Les années 1892 et 1897 à 1919 se vendent séparément **28** francs.
Les années 1920 et 1921 se vendent chacune **45** francs.
Les années 1887 (tome I), 1893 (tome VII), étant très rares, ne se vendent qu'avec la collection complète et au prix de **100** francs chacune.
Tables des Matières, années 1887 à 1906, 1 vol., 10 francs.

Monographies de l'Institut Pasteur. — **Histoire d'une idée. L'ŒUVRE DE E. METCHNIKOFF** (*Embryogénie. Inflammation. Immunité. Sénescence. Pathologie. Philosophie*), par A. Besredka, professeur à l'Institut Pasteur.
Paris, Masson et Cie, 1921, 135 pages . . . . **6** fr. *net*

35e ANNÉE DÉCEMBRE 1921 N° 12

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE DU MANGANÈSE DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL

par GABRIEL BERTRAND et Mme ROSENBLATT.

Depuis que Scheele a découvert, en 1785, le manganèse dans la magnésie noire et l'a retrouvé dans les cendres du cumin sauvage et du bois (1), de nombreux savants ont fait connaître, soit de simples observations, soit de véritables recherches sur l'existence du manganèse dans le règne végétal.

Herapath, en 1849, a signalé la présence du métal dans les cendres de la rave commune, de la rave de Suède, de la betterave et de la carotte.

Après lui, Richardson l'a indiquée dans les cendres de la canne à sucre, puis Salm Hortsmar dans celles de l'avoine.

En 1852, dans sa 35e lettre sur la chimie, Liebig écrit : « Le thé et le café sont remarquables en ce qu'ils renferment du fer et du manganèse. Lorsqu'on évapore à siccité une infusion limpide de thé pékoé ou souchong, et qu'on incinère le résidu, on obtient des cendres, souvent colorées en vert par du manganate de potasse, et dégageant, par conséquent, du chlore au contact de l'acide chlorhydrique.

Berthier, puis Leclerc (2), passant des observations qualitatives aux dosages, ont donné la teneur en manganèse des cendres

(1) *Mémoires de Chymie*, 1re partie, p. 39-115, Dijon, 1785.
(2) *C. R. Acad. Sciences*, **75**, p. 1205, 1872.

de quelques végétaux; la liste de leurs résultats a été beaucoup étendue dans la suite, notamment par les recherches de J. v. Schröder (1), de Maumené (2), de Pichard (3), de Gössel (4), et, il y a quelques années encore, de Jadin et Astruc (5).

De cet ensemble d'observations et de recherches, on pourrait conclure que la présence du manganèse est générale chez les plantes si Maumené n'avait signalé des exceptions remarquables et relativement nombreuses. « Il existe, d'après cet auteur, des végétaux où l'on ne trouve point de manganèse. On peut, ajoute-t-il, les diviser en deux classes : les uns, sans caractère chimique extraordinaire, tels que oranges, citrons, etc...; les autres contenant des composés sulfhydriques ou sulfocyanhydriques, comme l'ail, l'oignon, etc. » En outre, d'après Maumené, « le son ne contient pas de manganèse... La fraise en offre, non dans le réceptacle, mais dans la graine... Dans une feuille, celle du chou, les nervures et le tissu foliacé qu'elles soutiennent offrent des différences incroyables. Le tissu laisse une cendre blanche infusible ne contenant pas trace de manganèse; les nervures donnent une cendre très fusible où le manganèse existe en quantité très appréciable » (6).

Ces exceptions, si elles étaient réelles, présenteraient une grande importance au point de vue de la question biochimique du manganèse et de toutes les conséquences que l'on en peut tirer. Aussi nous a-t-il paru qu'on ne pouvait pas les admettre sans un nouvel examen. Nous avons été d'autant plus incité à entreprendre celui-ci que Maumené s'était contenté de déterminer le manganèse par la coloration verte des cendres chauffées jusqu'à la fusion. Il est vraisemblable que, dans ces conditions, le métal a pu lui échapper lorsque les cendres étaient insuffisamment alcalines ou difficilement fusibles.

Nous avons commencé notre examen par l'orange et le citron, auxquels nous avons joint la mandarine; puis nous avons analysé l'ail, l'oignon, et quelques plantes de la famille des

(1) 1878.
(2) *C. R. Acad. Sciences*, **98**, p. 1056 et 1416, 1884.
(3) *Ibid.*, **126**, p. 550 et 1882, 1898.
(4) *Beih. Bot. Cent.*, **18**, I, p. 119, 1905.
(5) *C. R. Acad. Sciences*, **155**, p. 406 et *Journ. Pharm. Chim.*, 7e série, **7**, p. 135, 1913.
(6) *Loc. cit.*

liliacées et de la famille des crucifères contenant, comme le spécifie Maumené, « des composés sulfhydriques ou sulfocyanhydriques » : l'asperge, le poireau, la bourse à pasteur, le radis, le navet, le sysimbre officinal, la moutarde et le cresson. Enfin, nous avons porté notre attention sur le son, la fraise et la feuille de chou. Dans le cas des fruits et de certaines plantes, nous avons recherché et dosé le manganèse dans les différentes parties, de manière à accroître encore le degré de nos connaissances sur la répartition du métal dans les organes végétaux.

Les substances analysées ont été débarrassées avec soin par lavage à plusieurs eaux des particules étrangères qui auraient pu fausser les résultats, les pesées à l'état frais ayant été faites avant le lavage. La détermination des cendres a été effectuée à la plus basse température possible, au rouge très sombre, en épuisant le charbon à l'eau chaude après carbonisation. Le dosage du manganèse, enfin, a été fait en suivant dans tous ses détails la méthode publiée autrefois par l'un de nous (1). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	EAU p. 100	CENDRES p. 100	MANGANÈSE en milligr. pour 100 gr. de MATIÈRE FRAICHE	MATIÈRE SÈCHE	CENDRES
Orange :					
Ecorce, partie externe	76,88	0,85	0,17	0,71	19,1
— — blanche	70,81	0,79	0,09	0,32	12,0
Tranches sans les pépins	88,13	0,43	0,04	0,31	8,4
Pépins	62,24	1,45	0,17	0,44	11,4
Citron :					
Ecorce, partie externe	73,85	1,51	0,17	0,65	11,3
— — blanche	72,85	1,21	0,07	0,26	6,0
Tranches sans les pépins	90,42	0,51	0,03	0,26	4,9
Pépins	54,94	1,41	0,24	0,53	17,0
Mandarine :					
Ecorce, partie externe	81,66	1,04	0,12	0,67	11,5
— — blanche	73,47	1,25	0,11	0,43	9,1
Tranches sans les pépins	86,11	0,56	0,03	0,21	5,2
Pépins	58,63	1,49	0,16	0,39	10,9
Ail :					
Gousses entières	62,28	1,44	0,055	0,15	3,8
Oignon :					
Bulbe entier	90,09	0,38	0,05	0,56	14,3

(1) *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, 9, p. 361, 1911.

	EAU p. 100	CENDRE p. 100	MANGANÈSE en milligr. pour 100 gr. de MATIÈRE FRAICHE	MATIÈRE SÈCHE	CENDRES
	—	—	—	—	—
Asperge :					
Tête (tiers supérieur)	92,26	0,88	0,21	2,70	23,7
Partie moyenne (2e tiers)	93,73	0,48	0,18	2,90	37,6
Poireau :					
Entier	87,58	0,81	0,09	0,73	11,3
Bourse à pasteur :					
Racines	64,48	7,52	5,00	17,6	89,7
Feuilles	81,54	4,13	2,24	11,1	72,5
Fruits	71,60	2,18	2,22	9,92	99,8
Radis rose rond :					
Peau	93,53	0,72	0,10	1,56	14,0
Chair	94,64	1,08	0,11	2,12	10,5
Radis rose rond (autre provenance) :					
Peau	93,10	0,74	0,09	1,26	11,8
Chair	95,84	0,77	0,05	1,10	6,1
Feuilles	92,06	1,92	0,32	4,04	16,7
Radis noir :					
Ecorce	87,80	2,18	0,72	5,94	33,3
Chair	93,22	1,02	0,08	1,27	8,4
Navet long :					
Racine	94,54	0,66	0,05	1,02	8,4
Feuilles	94,00	1,07	0,21	3,60	19,9
Sysimbre officinal :					
Feuilles	»	»	»	11,20	61,8
Moutarde blanche :					
Graine	7,32	5,42	3,60	3,88	66,4
Moutarde noire :					
Graine	7,80	3,60	2,50	2,71	69,4
Cresson (1) :					
Tiges et feuilles	93,86	1,16	0,16	2,51	13,9
Froment :					
Son	18,93	4,87	3,15	3,90	65,0
— (autre provenance)	10,80	4,60	5,50	6,16	119,6
Fraise (Héricart) :					
Partie superficielle avec les graines	87,26	0,35	0,51	4,04	146,9
Reste au réceptable	91,11	0,18	0,26	2,88	142,8
Feuille de *Chou* :					
Nervure principale	88,48	1,81	0,24	2,11	13,4
Nervures secondaires (2)	86,72	1,50	0,54	4,05	35,7
Limbe	81,66	3,48	1,15	6,30	36,6

(1) Jadin et Astruc ont aussi trouvé du manganèse, en utilisant la méthode d'analyse dont nous nous sommes servis, dans l'orange, la mandarine, l'asperge, le poireau, le radis, le navet et le cresson (*Journ. Pharm. Chim.*, déjà cité).

(2) Auxquelles adhérait une proportion notable de limbe, difficile à séparer.

On voit, par ces résultats, qu'aucune des exceptions signalées par Maumené ne peut être retenue. Si ce savant s'est trouvé parfois devant des résultats négatifs, c'est certainement, comme nous l'avions supposé au commencement de nos recherches, à cause de l'insuffisance de la méthode analytique dont il s'est servi, méthode qui, avec les diverses parties de la feuille de chou, a même fait ressortir une répartition du métal inverse de celle qui existe en réalité.

Notre tableau montre, en effet, que c'est dans le limbe et non dans les nervures qu'il y a la plus grande proportion de manganèse. Il en est d'ailleurs de même dans le cas du raisin. D'après Maumené, il faut distinguer dans ce fruit la pulpe et les pépins ; ceux-ci ne contiennent « que des traces infiniment petites » de manganèse. Or, nous avons obtenu :

	EAU p. 100	CENDRES p. 100	MANGANÈSE en milligr. pour 100 gr. de MATIÈRE FRAICHE	MATIÈRE SÈCHE	CENDRES
Raisin blanc :					
Peau	88,38	0,72	0,13	1,09	17,4
Pulpe	86,62	0,39	0,24	1,81	62,7
Pépins	66,95	0,93	1,87	5,67	200,0
Râfle	68,68	2,53	3,99	12,74	15,5
Raisin noir :					
Peau	75,14	1,10	0,12	0,48	10,6
Pulpe	87,08	0,24	0,01	0,08	4,2
Pépins	37,79	1,97	0,55	0,89	27,8
Râfle	58,47	2,08	0,29	0,70	14,0

D'après ces nombres, les pépins sont donc, au contraire, plus riches que les autres parties du raisin.

En résumé, chaque fois que l'on a recherché le manganèse dans une plante ou une partie de plante, à l'aide d'une méthode analytique exacte et suffisamment sensible, on a obtenu un résultat positif. La présence du manganèse est donc absolument générale chez les plantes : il existe à la fois dans tous les organes et dans toutes les espèces du règne végétal.

ÉTUDES SUR LA FERMENTATION DES CERISES

par Charles SCHWEIZER

(PREMIER MÉMOIRE)

LEVURES DU GENRE *SACCHAROMYCES* ISOLÉES DE MACÉRATIONS DE CERISES

Au printemps, de véritables forêts de cerisiers couvrent de leurs voiles blancs de vastes surfaces autour du Rigi, dans le Jura bâlois, dans la Forêt-Noire, etc., nous démontrant l'importance que la culture des cerises a acquise dans ces contrées. De pair avec cette culture marche une industrie agricole, également très importante, produisant une eau-de-vie des plus recherchées, nommée l'eau-de-vie de cerises, connue sous le nom de *kirsch.* Pour obtenir ce produit, on entasse ordinairement les cerises dans des tonneaux et les abandonne à la fermentation spontanée ; après la fermentation, on procède à la distillation à feu nu ou à la vapeur indirecte. L'emploi de cultures pures pour la mise en fermentation de la macération de cerises est encore très peu en usage ; dans les rares exceptions on se sert de préférence de levures de vin. Je me suis donc proposé de *rechercher dans des macérations de cerises des levures qui conviendront particulièrement à la fabrication du kirsch à l'aide de cultures pures.* Ces macérations ont d'une part été préparées au laboratoire en petit et d'autre part en grand dans la distillerie X. Fischlin, à Arth (Rigi). Le prélèvement des échantillons de ces macérations en grand a été fait par le propriétaire de cette usine, M. le Dr H. Fischlin. Il va sans dire que toutes les précautions ont été prises pour éviter une pénétration de germes étrangers.

Sitôt reçus au laboratoire, les échantillons ont été soumis au *triage* d'après la méthode que Koch a instituée en 1883 pour le triage des bactéries et que Hansen a appliquée également aux levures.

Pour la *détermination* des espèces, j'ai fixé pour chaque levure isolée les données suivantes :

1° Examen de l'*aspect de la végétation* dans du moût de bière à 10° Balling (correspondant à une densité de 1,040 = 10,3 p. 100 d'extrait) de la *forme et des dimensions des cellules* qui se sont développées pendant deux jours et à 20° dans ce même milieu. Il me semble assez important d'arriver ici à une unification de la méthode, aussi bien en ce qui concerne la nature du milieu employé que sa concentration. Certains auteurs ont employé pour cet examen du moût de vin ou de cidre et très souvent aussi le milieu dont ils avaient isolé la levure ; mais, pour la détermination des espèces, il est recommandable d'employer toujours le même milieu et à la même concentration. Le moût de bière se trouve un peu partout où il y a des brasseries et, dans les autres contrées, on peut facilement le préparer au laboratoire avec du malt touraillé ; dans les brasseries on demandera de préférence du premier moût non houblonné que l'on diluera ensuite au laboratoire à 10° Balling. Dans mes recherches, j'ai employé du moût servant à la fabrication de bière brune.

2° Examen de la forme et de l'aspect d'une *colonie géante* cultivée pendant trois semaines à 20° sur du moût de bière à 10° Balling solidifié par une adjonction de 12 p. 100 de gélatine.

3° Examen d'une culture jeune en *plaque* ainsi que de cultures en *strie* et en *piqûre* sur le même milieu.

4° Examen de la *sporulation* sur blocs de plâtre. Dans les laboratoires de M. le professeur R. Chodat à Genève, on se sert de plaques de porcelaine dégourdie à la place des blocs de plâtre et ces plaques sont beaucoup plus pratiques : dans un large tube, étranglé vers le bas, comme ceux qu'on emploie à la culture sur tranches de pommes de terre, repose une plaque en porcelaine dégourdie, dont une des extrémités est plus étroite et qui seule plonge dans l'eau. On stérilise le tout et ensuite on ensemence en strie la levure à la surface de la plaque. Cette méthode a l'avantage de rendre le danger d'infection beaucoup moindre ; mais on ne peut pas se procurer ces plaques partout. C'est pour cette raison que, malgré les avantages incontestables de celles-ci, je me suis servi de blocs préparés avec des quantités égales de plâtre et d'eau, que j'ai placés ensuite dans des vases

de Petri stériles, après les avoir stérilisés et nettoyés dans de l'eau bouillante. On ajoute un peu d'eau stérilisée pour maintenir une humidité suffisante. J'ai observé à différentes températures le temps nécessaire aux différentes espèces jusqu'à l'apparition des premiers rudiments de sporulation, ceci en raison de l'importance attachée par Hansen à la détermination des températures maxima, optima et minima, ainsi que le temps nécessaire à la formation des ascospores à diverses températures intermédiaires. Il me semble pourtant suffisant de choisir une seule température conventionnelle et de déterminer exactement le temps que les levures mettent à sporuler à cette température. On se servira de préférence de la température de 25°, l'optimum de la plupart des levures se trouvant dans le voisinage de cette température. Pour certaines levures le mode de germination des ascospores a également quelque importance ; cette germination peut être observée dans une préparation microscopique ordinaire, en remplaçant l'eau par du moût de bière. J'ai chaque fois noté le nombre des spores, ainsi que leur aspect et leurs dimensions.

5° Examen de la *fermentation* de différents sucres ; pour le genre Saccharomyces, des essais avec la dextrose, la maltose, la saccharose et la lactose sont suffisants.

6e Examen de la *fermentation* d'un moût de bière à 10° Balling également avec détermination de la quantité d'alcool et du volume de levure formés. Cette dernière détermination peut se faire facilement par centrifugation dans des précipitomètres gradués, comme je l'ai pu démontrer récemment (1) ; elle ne donne d'ailleurs que des résultats comparatifs. Dans le cas spécial qui m'occupe ici, j'ai en même temps fait une fermentation en moût de cerises. Cette dernière ne m'a pas servi à l'identification des espèces, mais plutôt à obtenir quelques renseignements préliminaires sur leur valeur pour la fermentation industrielle des cerises. Sur la proposition de M. le Dr Th. v. Fellenberg, nous avons en même temps déterminé l'acidité volatile produite dans les fermentations des moûts de cerises ; elle ne montrait aucune proportionnalité avec l'alcool formé.

(1) *Travaux de Chimie alimentaire et d'Hygiène*, **11**, p. 193 (1920).

Nous passons maintenant à l'énumération des représentants du genre *Saccharomyces* que nous avons réussi à isoler des macérations de cerises et qui, seuls, peuvent jouer un rôle dans la fermentation par cultures pures. Nous savons que ce groupe avait été créé par Meyen et nous y rangeons aujourd'hui toutes les levures capables de donner des ascospores à une seule membrane et germant par bourgeonnement. Comme le genre Saccharomyces comprend toutes les levures de distillerie, de fabriques de levure, de brasserie, de cidrerie et vinification et offre par conséquent un nombre considérable d'espèces, Hansen l'a divisé en six sous-groupes, classant les espèces d'après leur caractère de fermentation avec la dextrose, la maltose, la saccharose et la lactose.

PREMIER SOUS-GROUPE

Ici se rangent les levures faisant fermenter la dextrose, la saccharose et la maltose, mais n'agissant pas sur la lactose. Il me semble que, tout d'abord, nous pouvons encore distinguer dans ce sous-groupe un type qui se rapproche du *Saccharomyces cerevisiæ* et un autre qui a les caractères du *Saccharomyces Carlsbergensis* ; en outre, il reste encore un grand nombre de représentants de ce sous-groupe qui ne se rapprochent ni de l'un, ni de l'autre de ces deux types importants.

TYPE *CEREVISIÆ*

Le *Saccharomyces cerevisiæ Hansen* se distingue du *Saccharomyces Carlsbergensis* par ses colonies géantes en forme de rosette à bord fortement ondulé (fig. 1), ainsi que par sa faculté de former des ascospores beaucoup plus facilement et abondamment. J'ai réussi à isoler deux levures de ce type qui ne sont pas identiques avec le *Saccharomyces cerevisiæ Hansen* de la collection du Service suisse de l'Hygiène publique provenant du laboratoire de Carlsberg. Par analogie, je les ai désignés suivant leur origine de macérations de cerises comme *Saccharomyces cerasi I* et *II*.

Saccharomyces cerasi I, nov. spec.

Cette espèce a été isolée d'une macération de cerises, provenant des montagnes autour de Arth, dans le canton de Schwytz, qui avait été fermentée dans la maison X. Fischlin S.-A., à Arth.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Après vingt-quatre heures, il n'y avait pas encore d'écume ; le liquide est peu troublé et on observe

un dépôt assez bien sédimenté. Après deux jours, une forte écume s'était produite; sous le microscope les cellules ovales prédominaient. J'ai toujours pris les mesures d'une centaine de cellules, afin d'avoir les dimensions maxima, moyenne et minima d'après le calcul de probabilité. J'obtins ainsi les chiffres suivants :

Longueur	4,5 — **6,5** — 7,5 µ.
Largeur	3,0 — **4,5** — 5,5 µ.

Le chiffre au milieu indique la moyenne, autrement dit, le sommet de la courbe de probabilité; dans la suite j'indiquerai les mesures toujours de cette manière. On trouve exceptionnellement des formes en boudin jusqu'à 10 µ de longueur. Après quatre jours la fermentation est terminée, le liquide est devenu limpide et le dépôt, qui n'est pas collant, s'est très nettement sédimenté. Un anneau de levure très fin n'apparaît à la surface du liquide qu'après une huitaine de jours.

Colonie géante. — Sur du moût de bière gélatiné se développent après trois semaines des colonies en rosette du type *cerevisiæ*, c'est-à-dire à rayons très prononcés et à bord externe fortement ondulé. Au centre se trouve une concavité entourée d'un anneau et on observe de fines stries circulaires (fig. 2). La couleur est grisâtre.

Culture en plaque. — Les jeunes colonies ont déjà une concavité au centre et les bords sont fortement ondulés; la structure intérieure est uniformément épaisse.

Culture en strie. — Après trois jours à la température de 20°, les bords sont fortement ondulés.

Culture en piqure. — Après le même laps de temps, on observe un développement tout le long de la piqûre ainsi que beaucoup de bulles gazeuses dans le cylindre de gélatine. Après trois semaines, la gélatine est fortement troublée, mais une liquéfaction ne se produit que tardivement.

Sporulation. — Cette levure sporule très facilement sur bloc de plâtre Dans chaque asque se forment deux ascospores rondes qui ont un diamètre d'environ 3 µ. L'action de la température sur la sporulation est la suivante. Les premiers rudiments apparaissent:

A la température de	38°	au bout de	60	heures.
—	33°	—	48	—
—	28°	—	20	—
—	25°	—	12	—
—	22°	—	32	—
—	20°	—	32	—
—	15°	—	60	—
—	6°	point au bout d'un mois.		

La germination des ascospores se fait par gonflement et le bourgeonnement des cellules végétatives a lieu de préférence aux pôles.

Fermentation. — Avec le moût de bière à 10° Balling, on obtient au bout de quatre jours 2,4 p. 100 en volume d'alcool, tandis que ce chiffre est de 8,2 p. 100 avec un moût de cerises non dilué. 1 cent. cube de moût de bière contient après la fermentation 13,5 millim. cubes et le moût de cerises

12 millim. cubes de volume de levure, après une centrifugation à 2.000 tours pendant cinq minutes. L'acidité volatile produite dans le moût de cerises est de 3,5 grammes par litre.

Saccharomyces cerasi II, nov. spec.

Une espèce voisine de la précédente a été isolée d'un échantillon prélevé, par le Dr H. Fischlin, d'un tonneau de 600 litres de macération de cerises venant d'arriver à l'usine.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Après vingt-quatre heures, la fermentation commence à peine; on observe de l'écume à la surface et des bulles gazeuses montent dans le liquide peu troublé. Il s'est formé un fort dépôt. Après deux jours la surface est couverte d'une forte écume. Ici aussi, les cellules ovales prédominent et leurs dimensions sont les suivantes :

Longueur	5,5 — **7** — 8 μ.
Largeur	3,0 — **4** — 5,5 μ.

Après quatre jours la fermentation est terminée, le liquide se clarifie tout à fait et le dépôt un peu collant se sédimente nettement. Un anneau très fin et une peau mince apparaissent à la surface du liquide après une huitaine de jours.

Colonie géante. — Sur moût de bière gélatiné, on obtient également des colonies en forme de rosette du type *cerevisiæ*. Une concavité, au centre, est entourée d'un anneau peu élevé. Les rayons de la rosette sont un peu moins prononcés que chez le *Saccharomyces cerevisiæ*; le bord externe est également fortement ondulé et on distingue aussi de fines stries circulaires (fig. 3).

Culture en plaque. — Les jeunes colonies ont une concavité au centre, les bords sont également fortement ondulés et la structure intérieure est uniformément épaisse.

Culture en strie. — Les stries ont après trois jours un bord fortement ondulé et une rainure longitudinale au milieu. Après trois semaines, le bord est plus finement plissé et la strie offre un aspect brillant.

Culture en piqure. — Après trois jours à la température de 20°, on constate un développement tout le long de la piqûre et beaucoup de bulles gazeuses dans le cylindre de gélatine. Après trois semaines, la gélatine est uniformément troublée; une liquéfaction n'a lieu qu'après quelques mois.

Sporulation. — La sporulation se fait moins facilement que chez le *Saccharomyces cerasi I*. En ce qui concerne le nombre de spores formées par asque, celui de deux prédomine. Elles ont une forme ronde et également un diamètre de 3 μ. L'apparition des premiers rudiments de sporulation se fait :

A la température de	38°	au bout de	25	jours.
—	33°	—	17	—
—	28°	—	4	—
—	25°	—	3	—
—	22°	—	6	—

A la température de 20° au bout de 6 jours.
— 15° — 15 —
— 6° — 30 —

L'émission des spores a lieu par dissolution de la membrane. Le bourgeonnement des cellules végétatives se fait de préférence aux pôles de ces cellules.

Fermentation. — Dans le moût de bière à 10° Balling, la fermentation est terminée au bout de quatre jours et il s'est formé 3 p. 100 d'alcool en volume, tandis qu'on en obtient avec un suc de cerises 8,4 p. 100. Les deux liquides contiennent après la fermentation 9,75 millim. cubes de levure par cent. cube. L'acidité volatile du moût de cerises fermenté est de 2,5 grammes par litre.

TYPE *CARLSBERGENSIS*

Le *Saccharomyces Carlsbergensis* de la collection du Service suisse de l'Hygiène publique, provenant du laboratoire de Carlsberg, est un type bien différent du *Saccharomyces cerevisiæ*. La sporulation ne se fait que très difficilement et seulement dans les cultures âgées; d'autre part, les colonies géantes forment des rosettes à bord très peu ondulé (fig. 4). Je n'ai retrouvé qu'un seul représentant de ce type et qui se rapproche assez du *Saccharomyces Carlsbergensis*. Le *Saccharomyces cerasi II* décrit précédemment pourrait être considéré comme intermédiaire entre le *Saccharomyces cerasi I* et la levure que je vais décrire ci-après.

Saccharomyces Carlsbergensis var. cerasi.

Cette levure a été isolée d'un échantillon d'écume d'une macération de cerises de la maison X. Fischlin fils S. A., à Arth, tandis que le *Saccharomyces Carlsbergensis de Hansen* provient des brasseries du vieux Carlsberg, à Copenhague.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Après vingt-quatre heures, on observe de l'écume à la surface et des bulles gazeuses montent dans le liquide peu troublé; mais la fermentation est encore peu intense. Un dépôt très nettement sédimenté s'est formé. Le deuxième jour, la surface est entièrement couverte d'écume. Le microscope nous montre à ce moment des cellules ellipsoïdes ou en forme d'œuf ou de poire et quelques rares cellules pointues. Les dimensions sont les suivantes :

Longueur . . . . 5,5 — **7,0** — 8,0 μ.
Largeur . . . . 4,0 — **5,5** — 6,5 μ,

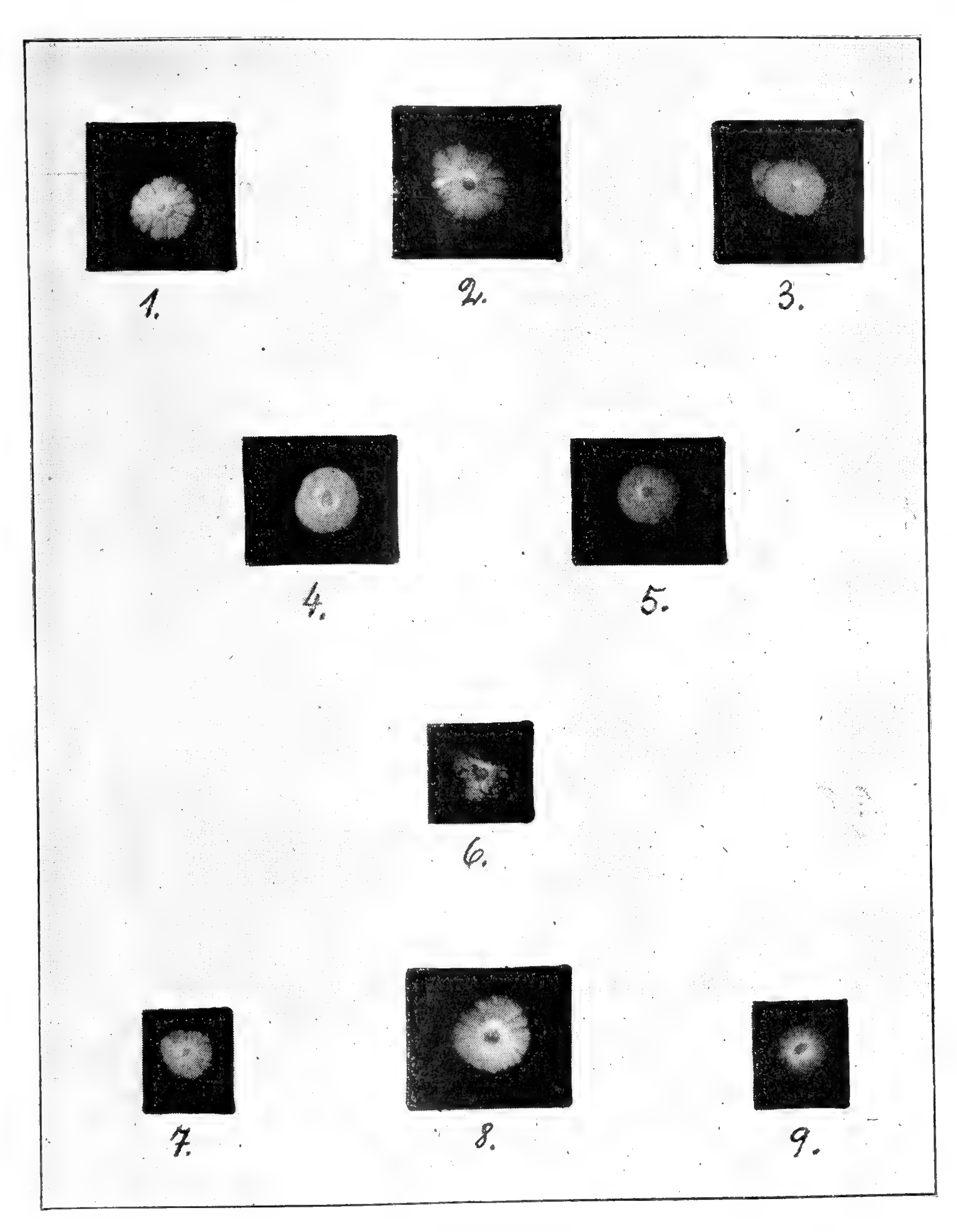
tandis que le *Saccharomyces Carlsbergensis Hansen* mesure :

Longueur . . . . 5,5 — **6,0** — 8,0 μ.
Largeur . . . . 4,0 — **5,5** — 7,0 μ.

Après quatre jours, la fermentation est terminée et le liquide s'est complètement clarifié. Le dépôt, assez fort, est un peu pâteux. Un anneau très fin ne se forme qu'après huit jours.

Colonie géante. — Sur du moût de bière gélatiné on obtient des colonies

en forme de rosette. Elles ont au centre une concavité qui se trouve au milieu d'un anneau saillant. Celui-ci est entouré lui-même d'anneaux concen-



1. *S. cerevisiæ Hansen.*
2. *S. cerasi I Schweizer.*
3. *S. cerasi II Schweizer.*
4. *S. Carlsbergensis Hansen.*
5. *S. Carlsbergensis* var. *cerasi Schweizer.*
6. *S. Chodati Schweizer.*
7. *S. Guilliermondii Schweizer.*
8. *S. Zopfii Artari.*
9. *S. Fischlinii Schweizer.*

triques, mais qui sont cependant moins prononcés que chez le type *cerevisiæ*. Le bord externe de la colonie est très peu ondulé (fig. 5).

Culture en plaque. — Les jeunes colonies montrent une concavité au milieu et un bord irrégulèrement ondulé.

Culture en strie. — Sur de la gélatine à moût de bière on obtient des stries à bords ondulés avec une rainure longitudinale au centre, elles offrent un aspect brillant. On constate un ramollissement de la gélatine après trois semaines, mais pas de liquéfaction même après six mois.

Culture en piqure. — On obtient un développement tout le long de la piqûre et dans le cylindre de gélatine on observe beaucoup de bulles gazeuses. Après trois semaines, la gélatine est uniformément troublée; la liquéfaction complète ne se produit qu'au bout de trois mois.

Sporulation. — La sporulation se fait aussi difficilement que chez le *Saccharomyces Carlsbergensis Hansen*; les ascospores ne se forment que rarement et en petit nombre,

Fermentation. — La fermentation est assez intense et dans le moût de bière à 10° Balling elle se termine en quatre jours avec 3,0 p. 100 d'alcool en volume. Avec le moût de cerises non dilué on en obtient 7,8 p. 100. Le volume de levure mesuré par contrifugation à 2.000 tours pendant cinq minutes dans des précipitomètres gradués, est, dans les deux milieux, de 12 millim. cubes par centimètre cube. Un litre de moût de cerises fermenté contient 3,0 grammes d'acide volatil.

Autres levures du premier sous-groupe.

J'ai enfin pu isoler une levure qui ne se rapproche ni du type cerevisiae, ni de celui du *Saccharomyces Carlsbergensis*, et cela surtout en ce qui concerne la forme de la colonie géante. Elle fermente également la dextrose, la saccharose et la maltose, mais non la lactose.

Saccharomyces Chodati, nov. spec.

Je dédie cette espèce à mon maître, M. R. Chodat, à Genève, en témoignage de mes vifs sentiments d'affection. Elle a été isolée de l'écume d'une macération de cerises de la distillerie X. Fischlin fils, à Arth. Elle se rapproche sous certains points de vue un peu du *Saccharomyces Willianus*, mais n'est pas identique avec cette levure.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Après vingt-quatre heures, la fermentation est déjà bien partie, le liquide est peu troublé et il s'est formé un dépôt assez épais qui n'est pas très nettement sédimenté. Au bout de quarante-huit heures, on constate au microscope une prédominance de cellules ovales, dont les dimensions, mesurées sur une centaine de cellules, sont :

Longueur	5,5 — 7,0 — 8,0 μ.
Largeur.	4,0 — 5,5 — 6,0 μ.

Après quatre jours déjà, une peau et un anneau assez épais se sont formés. Ils se détachent facilement en flocons pour tomber au fond du vase.

Colonie géante. — Sur du moût de bière à 10° Balling, rendu solide par une adjonction de 12 p. 100 de gélatine, se développent des colonies fortement plissées et à contour très irrégulier (fig. 6). Elles sont enfoncées au centre et ce centre est entouré d'un rempart également très irrégulier; le bord est fortement ondulé. La couleur est d'un blanc grisâtre.

Culture en plaque. — Les jeunes colonies sur du moût gélatiné ont une concavité au milieu et un bord fortement ondulé.

Culture en strie. — Après une culture de trois jours sur de la gélatine inclinée, la strie est fortement plissée et ses bords sont finement ondulés. Le même aspect s'observe encore au bout de trois semaines. Cette levure ne donne aucune liquéfaction, même après six mois.

Culture en piqure. — A la température de 20°, cette levure se développe tout le long de la piqûre et une bulle gazeuse se forme près de la surface. Après trois semaines, de petites colonies se sont développées dans toute la gélatine qui offre une surface très déchirée La gélatine n'est pas non plus liquéfiée.

Sporulation. — La sporulation se fait très facilement sur blocs de plâtre et les asques contenant les spores au nombre de deux prédominent. Ces ascospores rondes ont un diamètre variant de 1,5 à 3 μ, mais celui de 3 μ prédomine. Les premiers rudiments d'une sporulation apparaissent :

A la température de	38°	au bout de	84 heures.
—	33°	—	60 —
—	28°	—	20 —
—	25°	—	12 —
—	22°	—	60 —
—	20°	—	5 jours.
—	15°	—	6 —
—	6°	point au bout d'un mois.	

La germination des ascospores se fait par gonflement et le bourgeonnement des cellules végétatives formées se produit de préférence aux pôles de ces cellules.

Fermentation. — Dans du moût de bière à 10° Balling, la fermentation est terminée au bout de quatre jours. Dans ce milieu, il se forme 2 p. 100 d'alcool en volume, tandis que le moût de cerises en forme 8,5 p. 100. Le premier milieu contient après la fermentation un volume de 16 mm. c. 5 de levure dans 1 cent. cube; cette quantité n'est que de 7 mm. c. 5 dans le suc de cerises. Dans ce même liquide, j'ai également déterminé l'acidité volatile, qui est de 3,4 grammes par litre.

DEUXIÈME SOUS-GROUPE

Le deuxième sous-groupe de Hansen renferme les levures fermentant la dextrose et la saccharose, mais non la maltose et la lactose. J'ai réussi à isoler trois espèces qui se rangent ici et dont deux semblent être nouvelles.

Saccharomyces Guilliermondii, nov. spec.

Je me permets de dédier cette espèce à M. A. Guilliermond, à Lyon, l'auteur bien connu du livre « Les levures »; elle a été obtenue à partir d'une macération de cerises que j'avais préparée moi-même au laboratoire.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Au bout de vingt-quatre heures, il y a formation d'un dépôt un peu collant, sans que l'on observe de fermentation. Après deux jours apparaissent quelques îlots d'écume. En ce moment, les cellules ovales prédominent, mais on en trouve aussi des allongées et des rondes. Les dimensions, mesurées sur une centaine de cellules, varient dans les chiffres suivants :

Longueur	4,5 — **7,0** — 8,5 μ.
Largeur	3,0 — **4,5** — 7,0 μ.

On trouve également des formes en boudin jusqu'à 14 μ de longueur. Sans que la fermentation ne devienne jamais très intense, on observera après un mois la formation d'un anneau très faible, tandis que le liquide est parfaitement limpide.

Colonie géante. — Sur du moût de bière gélatiné on obtient des colonies ressemblant un peu à celles du *Saccharomyces cerevisiæ*. Le centre est pourtant peu enfoncé et on ne constate guère de stries circulaires. Le bord est fortement ondulé et les colonies ont une couleur grisâtre (fig. 7).

Culture en plaque. — Les jeunes colonies sur moût de bière gélatiné sont plates et ont un bord un peu ondulé.

Culture en strie. — Le bord de la strie est un peu ondulé et au milieu on observe une rainure longitudinale. La liquéfaction de la gélatine ne se fait qu'au bout de quelques mois.

Culture en piqure. — Un développement de levure se fait constater sur toute la longueur de la piqûre et près de la surface on observe une bulle gazeuse. Il y a une fermentation très intense; la gélatine se déchire fortement. La liquéfaction se fait également après quelques mois.

Sporulation. — La sporulation se fait assez bien sur blocs de plâtre. Les asques contiennent quatre spores rondes, d'un diamètre de 2 μ environ, disposées en tétrades. La formation des premiers rudiments se fait :

A la température de	38°	point au bout de	1 mois.
—	33°	—	24 heures.
—	28°	—	24 —
—	25°	—	12 —
—	22°	—	24 —
—	20°	—	32 —
—	15°	—	60 —
—	6°	—	15 jours.

La germination des ascospores a lieu par gonflement. Le bourgeonnement se fait en un point quelconque de la surface des cellules végétatives.

Fermentation. — La fermentation n'est pas très intense et dans le moût de bière à 10° Balling il se forme 1,5 p. 100 d'alcool en volume, tandis qu'on

atteint dans du suc de cerise 7 p. 100. Le volume de levure formé par centimètre cube est de 13 mm. c. 5 dans le premier milieu et de 10 mm. c. 2 dans le second. Un litre de moût de cerises fermenté possède une acidité volatile de 1 gr. 25 par litre.

Saccharomyces Zopfii Artari.

Cette levure avait été isolée par Artari d'un jus sucré d'une fabrique de sucre de Saxe et plus tard elle a été retrouvée par Guyot (1) dans la fermentation de la gentiane. J'ai également pu constater sa présence dans un échantillon prélevé par le Dr H. Fischlin, à l'arrivé à son usine, d'un fût de 600 litres de cerises du Fricktal fermentées.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — Après vingt-quatre heures, le liquide est troublé sans que la fermentation ait bien commencé et un dépôt assez fort et pas collant s'est formé. La fermentation ne devient jamais très intense et un anneau se forme après quatre jours. D'après Guyot, il n'y a jamais formation de voile. Pour les cellules âgées de deux jours, Artari avait trouvé un diamètre de 3 à 6 μ, exceptionnellement 8 μ. A côté des cellules rondes, on trouve également des formes ovales, mais jamais de boudin. Une mesure des dimensions sur une centaine de cellules m'a donné les chiffres suivants :

Longueur	4,0 — **7,0** — 8,0 μ.
Largeur	3,5 — **5,5** — 7,0 μ.

Colonie géante. — Les colonies, en forme de rosettes, se rapprochent du type cerevisiæ. La concavité au centre est entourée d'un anneau peu élevé, le bord externe est fortement ondulé et on observe de fines stries circulaires (fig. 8).

Culture en plaque. — Les jeunes colonies sur du moût de bière gélatiné ont une forme convexe et un bord irrégulièrement ondulé; elles ont un aspect grisâtre et brillant.

Culture en strie. — Le bord de la strie est un peu ondulé et devient plus tard finement plissé. On observe un ramollissement de la gélatine, et puis liquéfaction complète. Guyot avait obtenu cette liquéfaction au bout de un mois et demi.

Culture en piqure. — Cette levure se développe également tout le long de la piqûre et beaucoup de bulles gazeuses se forment dans la couche de gélatine. Après trois semaines, celle-ci est uniformément troublée et on constate également une liquéfaction tardive.

Sporulation. — La sporulation de la levure d'Artari s'effectue facilement aussi bien sur les milieux liquides que sur les milieux solides. Sur blocs de plâtre, je n'ai pas obtenu une sporulation très riche. Le nombre des spores peut varier de 1 à 4, mais celui de 2 prédomine. Elles ont une forme sphérique et un diamètre de 1,5-3 μ. D'après Artari, la sporulation se fait à la température de 29-30° au bout de vingt et une heures. D'après Guyot, l'émission des spores se fait par gélification de la membrane.

(1) *Le Gentiana lutea L. et sa fermentation. Thèse*, Genève, 1917.

Fermentation. — Quoique la formation d'écume ne fût pas très intense, il se produisit 8,2 p. 100 d'alcool en volume dans le suc de cerises et 2,4 p. 100 dans le moût de bière à 10° Balling. Le volume de levure formée par centimètre cube était de 11 millim. cubes dans le premier cas et de 12 millim. cubes dans le second. Le moût de cerises fermenté atteignit une acidité volatile de 4,5 grammes par litre. Dans le moût de vin, Guyot avait obtenu 8,18 p. 100 d'alcool, c'est-à-dire un chiffie assez voisin de celui obtenu avec le suc de cerise. Guyot a de même constaté une forte production d'éthers.

Saccharomyces Fischlinii nov. spec.

Je dédie cette levure à M. H. Fischlin pour lui témoigner ma reconnaissance pour sa précieuse collaboration. Cette espèce se trouva après deux mois dans une fermentation de cerises de la Gerbiweid, près Hertenstein.

Culture dans du mout de bière a 10° Balling. — La fermentation commence lentement, mais après vingt-quatre heures le liquide est déjà un peu troublé. Le dépôt est assez fort et collant; un anneau fin apparaît au bout de huit jours. Le lendemain plusieurs îlots d'écume se sont formés et sous le microscope on observe surtout des cellules ovales, mais aussi des formes en boudin et rondes. La mesure sur une centaine de cellules a donné les dimensions suivantes :

Longueur.	4,5 — **7,0** — 8,5 μ.
Largeur.	3,0 — **4,5** — 5,5 μ.

Colonie géante. — Sur du moût de bière à 10° Balling, solidifié par une adjonction de 12 p. 100 de gélatine, on obtient des colonies du type Carlsbergensis; le bord est peu ondulé et finement plissé, mais la concavité du centre est plus large que chez la levure de Carlsberg (fig. 9).

Culture en plaque. — Les jeunes colonies ont une forme convexe et un bord finement strié.

Culture en strie. — Les bords de la strie sont un peu ondulés et finement plissés. Cette levure liquéfie la gélatine au bout de quelques mois.

Culture en piqûre. — Il y a développement tout le long de la piqûre et on observe une bulle gazeuse près de la surface. Dans toute la gélatine, il se forme de petites colonies et plus tard la gélatine se liquéfie, mais seulement après quelques mois.

Sporulation. — La sporulation se fait très facilement et extrêmement abondamment sur blocs de plâtre. Les asques contiennent de préférence un nombre de quatre spores, d'une forme sphérique et d'un diamètre variant entre 2 et 3 μ, disposés en tétrades. Les premiers rudiments apparaissent :

A la température de	38°	point au bout d'un mois.		
—	39°	au bout de	48	heures.
—	28°	—	32	—
—	25°	—	12	—
—	22°	—	36	—
—	20°	—	32	—
—	15°	—	60	—
—	6°	—	15	jours.

La germination des ascospores se fait par gonflement.

Fermentation. — La fermentation est assez lente. Dans un moût de bière à 10° Balling, il se forme 2 p. 100 d'alcool en volume et 17 mm. c. 6 de volume de levure par centimètre cube. Dans du suc de cerises, on a obtenu 8 p. 100 d'alcool et 7 mm c. 5 de levure par centimètre cube; l'acidité volatile produite dans ce milieu a été de 1,25 grammes.

Cette levure se rapproche sous certains points de vue du *Saccharomyces coreanus Saito*, mais en est pourtant bien distincte.

Nous avons donc réussi à isoler de macérations de cerises sept espèces de levures appartenant au genre *Saccharomyces*. Dans un prochain mémoire nous espérons pouvoir donner quelques résultats sur l'application de ces levures pures à la fermentation des cerises dans le but de les employer à la fabrication du kirsch. Outre ces saccharomycètes, nous avons également pu isoler un certain nombre d'autres levures et de bactéries; nous avons l'intention d'y revenir plus tard. La mycologie de la fermentation spontanée des cerises semble donc être assez variée.

Berne (Service Suisse de l'Hygiène publique, laboratoire de Bactériologie).

INFECTION PUERPÉRALE
ET LE SÉRUM ANTISTREPTOCOCCIQUE PRÉPARÉ
D'APRÈS UNE MÉTHODE NOUVELLE

par Mme S. KRONGOLD-VINAVER.

(Travail du laboratoire de M. le professeur Borrel, Institut Pasteur, et de la Clinique obstétricale Baudelocque, service de M. le prof. Couvelaire.)

La nature microbienne de l'infection puerpérale a été mise en cause déjà en 1862. On recherche le germe d'abord uniquement dans les lochies (Mayerhofer 1863-1865), Rokitansky (1864), Haussmann (1870) sans pouvoir le définir. En 1869, Coze et Feltz (deux Français) trouvent chez les femmes infectées *dans le sang* des microbes en chaînettes sans pouvoir les cultiver.

C'est en 1879, avec les travaux de Pasteur, que la doctrine microbienne de l'infection puerpérale se trouve solidement assise. Pasteur fut le premier à isoler, à cultiver ce microbe, à en donner les caractères et à montrer le rôle principal joué par lui dans les accidents infectieux d'origine puerpérale.

Les travaux de Pasteur ouvrirent une ère nouvelle dans l'histoire de l'infection puerpérale et devaient être le point de départ des recherches qui suivirent. On discuta beaucoup la pluralité des germes dans l'infection puerpérale, attribuant à chaque espèce la faculté de déterminer une forme spéciale de la maladie (Doléris 1880). Les recherches ultérieures n'ont pas confirmé cette classification de Doléris (Chauveau 1882, Arloing 1884), démontrant, au contraire, que la forme avec la suppuration localisée autour de l'utérus, ainsi que la forme pyohémique, forme pseudo-membraneuse de fièvre puerpérale, forme septicémique pure, sans suppuration, la phlegmatia alba dolens, toutes sont dues à un même germe : le streptocoque pyogène (Widal 1889).

A la discussion sur unité et pluralité étiologique de l'infec-

tion puerpérale fait suite l'étude sur l'origine même de l'infection. Les débats s'ouvrent sur l'infection d'origine hétérogène ou endogène.

Depuis 1887, deux opinions s'établissent. D'après certains auteurs, les sécrétions utérines normales des femmes enceintes ne contiennent pas de germes pathogènes habituels de l'infection puerpérale (Krönig, Menge, Williams, Bergholm, Natvig). Les germes qui s'y trouvent ne sont que des saprophytes (hétéro-infections) (Gönner) qui d'ailleurs sont capables d'acquérir, dans les sécrétions devenues pathologiques ou dans les résidus mortifiés, une action virulente rapide (Doléris, Fabre). Pour d'autres, les micro-organismes contenus dans le canal génital de la femme saine sont des pathogènes et l'auto-infection est possible (Kaltenbach 1889), Steffeck (1891), Fabre et Bourret (1910), Schweitzer (1913), Perman (1917), Rustra (1920).

Pour certains autres encore, l'infection peut être polymicrobienne aéro-anaérobie (Jeannin, Doederlein, Burkhardt, Schiavoni, etc.) et pour d'autres due toujours à un seul germe : le streptocoque.

Tous, depuis la découverte de Pasteur, sont unanimes à dire que le streptocoque, associé ou non à d'autres microbes pathogènes, est le germe le plus redoutable que l'accoucheur ait à combattre. Les recherches bactériologiques sur la nature même de ce streptocoque se multiplient alors.

On étudie la relation entre la virulence du streptocoque et son pouvoir hémolytique, tant au point de vue du pronostic, de la thérapeutique, que de la prophylaxie de la fièvre puerpérale. On essaye d'établir le pronostic ainsi qu'un traitement rationnel en se basant sur le pouvoir hémolytique et le degré de virulence du streptocoque (E. Sachs, Schottlander, Fromme et Heynemann, Sigvart, Metzger, Winter, Fabre, Gonnet).

Mais les faits ont démontré que l'incapacité d'hémolyse n'entraîne pas la non-virulence. L'étude de l'hémolyse échoue au point de vue du diagnostic et du pronostic de la fièvre puerpérale (Labusquière). La présence de streptocoque dans le sang assombrit le pronostic, qu'il s'agisse d'ailleurs de streptocoque hémolytique ou non hémolytique (Bassard, Gonnet).

Fabre, dans son Traité, *Précis d'Obstétrique* (1910), pré-

conise l'examen bactériologique des lochies dans le but de déterminer si une infection puerpérale donnée est due ou non à la présence du streptocoque dans la cavité utérine, et en vue de réaliser l'isolement des porteuses de streptocoques avant même que les symptômes cliniques aient permis le diagnostic.

Zangemeister (1910) conseille, dans la lutte contre les infections puerpérales, des prélèvements de sécrétions, cultures, examens, méthode identique à celle que l'on a instituée pour la lutte contre la diphtérie.

D'autres, enfin, cherchent encore le germe dans le sang, pour porter, à une époque déjà avancée de l'infection, le pronostic de la fièvre puerpérale (Lenhartz 1903, Warnekros 1912, Potocki 1918). Mais le streptocoque, au cours d'une infec tion, peut manquer dans le sang (Widal, Lemierre, Guéniot) ou s'y montrer d'une façon intermittente (Basset, Ettlinger).

D'autre part, une étude récente de Potocki (1918-1919) indique qu'au-dessus de 38° le sang des infectées puerpérales est envahi dans la proportion du tiers ou de la moitié des cas.

Toutes ces données se montrant imprécises au point de vue des indications rationnelles dans le traitement des infections puerpérales, la « bactériologie puerpérale » fut jugée insuffisante dans la lutte thérapeutique et prophylactique de la fièvre puerpérale. On revient alors au seul terrain familier, le terrain clinique, se proposant d'étudier les moyens de combattre l'infection dès ses premiers symptômes.

Jusqu'à 1892, trois armes existaient pour combattre l'infection puerpérale; injection intra-utérine (connue depuis le XVIIIe siècle et vulgarisée par Pinard 1895, Tarnier 1894), irrigation continue (Pinard et Tarnier) et curettage (Doléris, Pozzi, Champetier de Ribes, Pinard et Wallich).

Les inconvénients, que l'un et l'autre procédé présentaient, étaient discutés par de très nombreux auteurs (deux écoles se trouvent encore aujourd'hui en présence, les interventionnistes et ceux qui s'opposent à tout traitement local dans les cas de bactériémies). Ensuite, on s'est attaqué plus directement à l'infection par les abcès de fixation (méthode de Fochier) par les injections des substances antiseptiques (sublimé thymol), de sérum physiologique à dose massive, d'argent colloïdal, de sulfate de cuivre ammoniacal et enfin par la sérothérapie.

Avec l'année 1895, l'infection puerpérale entre dans une nouvelle voie. On est dans une période d'expérimentation où l'on cherche si l'infection puerpérale peut être combattue par l'emploi de sérum spécifique provenant d'animaux vaccinés. Ces derniers sont immunisés contre le streptocoque, agent le plus redoutable, des infections puerpérales pour essayer de préparer un sérum antistreptococcique préventif et curatif.

Les sérums qui ont été employés dans le traitement des infections puerpérales furent celui de MM. Charrin et Roger (1892), sérum de mulet préparé avec un streptocoque de l'érysipèle; le deuxième était celui de Marmorek (1895), sérum de cheval préparé avec une souche dont la virulence fut exaltée par le passage sur les lapins. (A partir de 1905, le sérum de Marmorek fut remplacé, à l'Institut Pasteur, par le sérum polyvalent de Besredka).

En même temps que le sérum, on pratiqua, simultanément, chez les femmes infectées ou suspectes d'infection, un traitement local antiseptique ou chirurgical. Aucun examen bactériologique (ou exceptionnellement) ne précédait l'emploi du sérum (Laran 1896, Pinard et Wallich 1909).

Les résultats obtenus se sont montrés inconstants et en 1907, dans le rapport de Turenne, au III[e] Congrès médical latino-américain tenu à Montevideo, on pouvait lire cette conclusion : « il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement rationnel, direct, pratique de l'infection puerpérale ».

La question du streptocoque, a dit M. Couvelaire le 20 janvier 1921 dans sa leçon sur la « Prophylaxie et le traitement des fièvres puerpérales », — « est toujours encore ouverte, le problème du traitement des infections streptococciques n'a pas encore reçu de solution satisfaisante ».

A l'heure actuelle, on meurt encore d'infection puerpérale. Cette mortalité, si minime qu'elle soit, nous prévient que le dernier mot n'a pas été dit, qu'il serait nécessaire d'avoir en main un moyen rapide pour permettre au praticien un diagnostic bactériologique tel que nous le faisons pour la diphtérie et de pouvoir établir un traitement sérothérapique efficace, précoce et rationnel. Il nous a semblé de toute importance, à M. Couvelaire et à moi, de pouvoir porter *ce diagnostic bactériologique avant* qu'apparaisse l'infection et d'instituer, lors de

la première élévation de température (toute cause infectieuse extra-utérine étant éliminée), un traitement sérothérapique rationnel, sans laisser le temps aux microbes de diffuser et de franchir la barrière utérine.

Seul l'examen bactériologique des lochies, fait dans les premières heures qui suivent l'accouchement, peut et doit, par la présence ou absence de streptocoques, donner un avertissement, un moyen de pronostiquer une infection possible ou probable.

* * *

Dans nos recherches sur l'immunité antistreptococcique (1), nous avons vacciné des chevaux contre le streptocoque avec une seule injection d'une culture vivante de streptocoque avant la saignée, contrairement à la méthode d'immunisation longue et fractionnée, pratiquée jusqu'à présent. Le streptocoque qui nous sert à préparer le sérum est de provenance humaine (pleurésie post-grippale (1918), souche due à l'obligeance de M. le Dr Cazin (2).

Le sérum est obtenu par des culture *ne subissant aucun passage par l'animal.*

La méthode d'immunisation à laquelle nous nous sommes arrêtée, après plusieurs recherches, est la suivante : On injecte dans la veine du cheval 80 cent. cubes de culture de vingt-quatre heures de notre streptocoque en bouillon ascite (milieu Legroux, *C. R. Soc. Biol.*, 17 avril 1920), l'animal est saigné quatorze à quinze jours après l'injection. On laisse en repos le cheval dix à quinze jours et on le réinjecte de nouveau et ainsi de suite.

Titré sur la souris de 15 à 20 grammes, notre sérum, ainsi obtenu, la protège à la dose de 0 c. c. 1 (sérum injecté sous la peau) vingt-quatre heures avant l'inoculation de 0 c. c. 1 de culture de notre streptocoque (dose 100 fois mortelle).

Les propriétés thérapeutiques, chez l'homme, furent étudiées

(1) S. Vinaver et V. Frasey, Recherches expérimentales sur l'immunité antistreptococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 7 juin 1919.

(2) Les caractères biochimiques de ce streptocoque furent étudiés et exposés à la *Société de Biologie*, le 6 mars 1920 ; S. Krongold-Vinaver, Pouvoir pathogène et virulence des streptocoques.

dans le service de M. le professeur Couvelaire (Clinique obstétricale Baudelocque).

Nous exprimons ici toute notre reconnaissance à M. le professeur Couvelaire, qui a bien voulu nous donner la possibilité de faire cette étude dans son service et nous le remercions de l'intérêt qu'il n'a cessé de porter à nos recherches ainsi que des précieux conseils prodigués pendant toute la durée de ce travail.

Le 14 février 1921, M. Couvelaire a bien voulu communiquer à la Société de Gynécologie et d'Obstétrique (1) quelques résultats obtenus et nous apportons aujourd'hui nos observations détaillées ainsi que l'ensemble des faits qui se dégagent d'un grand nombre d'examens bactériologiques pratiqués chez les accouchées. Nous avons examiné, à la Clinique Baudelocque, 626 accouchées.

Les prélèvements des sécrétions utérines ont été faits dans les vingt-quatre, trente-six, ou quarante-huit heures qui suivaient l'accouchement.

Technique.

Pour faire les prélèvements des sécrétions utérines, nous nous sommes servi de spéculums et de tampons de coton hydrophile montés sur des fils de fer, les premiers stérilisés à l'étuve, les seconds au four Pasteur. Le tampon de coton est introduit très doucement dans le col et retiré aussitôt après pour être trempé dans un tube de bouillon simple. Le tube est porté à l'étuve à 37° et examiné vingt-quatre heures après.

La recherche du streptocoque à l'état de pureté ou non, dans ce premier tube de bouillon, est complétée ensuite par son isolement sur le milieu solide (gélose).

Le triage, l'identification de nos streptocoques et la définition de tous leurs caractères biochimiques ont été faits en collaboration avec Mme de Trévise, du Laboratoire de M. Tissier (2). (Nous sommes heureux de la remercier, à cette occasion, de son précieux concours.) Chaque streptocoque isolé fut étudié dans les milieux suivants : bouillon simple, bouillon au sang humain, bouillon glucosé, bouillon saccharosé, gélose simple, gélose tournesolée, lait, gélatine.

La virulence des germes était éprouvée sur les souris, 0 c. c. 1 d'une culture

(1) S. Krongold-Vinaver, Contribution à l'étude du traitement des infections puerpérales streptococciques par un sérum antistreptococcique préparé suivant une méthode nouvelle. *Bull. de la Soc. de Gyn. et d'Obs.*, n° 2, 1921.

(2) M. Tissier, de l'Institut Pasteur, s'intéressait à nos recherches, nous saisissons l'occasion pour l'en remercier ainsi que de ses avis autorisés qu'il a bien voulu nous prodiguer.

de vingt-quatre heures était injectée sous la peau d'une souris de 15 à 20 grammes. Lorsqu'à cette dose, la souche du streptocoque se montrait mortelle pour la souris, on la conservait en bouillon ascite, à la glacière, dans des tubes scellés.

L'activité de nos virus ainsi conservés est vérifiée ensuite par les repiquages et titrages répétés après un laps de temps défini (de trente à quarante jours de séjour à la glacière).

Nous remarquerons de suite que sur les 241 streptocoques isolés chez les femmes en couches, et que nous avons eu l'occasion d'étudier, quatre streptocoques seulement se sont montrés virulents pour la souris. De ce nombre, deux furent mortels pour la femme. Aucun parallélisme n'existait entre la virulence du streptocoque et son action hémolytique, ni entre la virulence pour les animaux de laboratoire et le pouvoir pathogène pour l'homme.

Dans les 3 cas mortels, le streptocoque fut hémolytique dans un seul cas. Très souvent la présence du streptocoque (d'ailleurs hémolytique parfois) dans les lochies ne s'accompagnait d'aucune élévation de température, quelquefois il causait une petite élévation thermique (38°) passagère sans autre accident et dans 41 cas (30 str. non hémolytiques, six, dont 3 moyennement hémolytiques et 2 légèrement hémolytiques) il y avait infection à forme localisée ou généralisée.

Chez les 385 femmes dont les lochies se sont montrées *privées de streptocoque*, nous n'avons jamais noté un cas de fièvre.

Guidés par l'examen bactériologique, présence ou absence des streptocoques dans les lochies, fait dans les premières heures de l'accouchement, nous avions recours aux injections de notre sérum antistreptococcique dès les premiers signes caractérisés d'infection.

Notre sérum antistreptococcique fut employé à titre curatif à l'*exclusion de tout autre traitement local*.

Mode d'emploi du sérum.

Dans les cas d'infection localisée, nous avons pratiqué les injections sous-cutanées de notre sérum, dans les formes généralisées (septicémie, hémoculture positive en streptocoques) des injections intraveineuses (1).

(1) M. Vignes, ancien chef de la Clinique Baudelocque, M. Cleisz, chef de clinique, M. Champeau, adjoint au laboratoire et M. Guillemet, moniteur, nous ont prêté un concours dont nous leur sommes très reconnaissant.

Les doses employées étaient :

Pour les injections sous-cutanées 60 cent. cubes par jour pendant trois jours consécutifs.

Pour les injections intraveineuses on dilue 20 cent. cubes du sérum dans 180 cent. cubes d'eau physiologique à 37°. Les 20 premiers centimètres cubes de la dilution seront poussés *très lentement*, le reste plus vite (procédé du Dr Cruveilhier, Ces *Annales*, juillet 1919). La durée de l'injection est de 30 à 40 minutes.

On renouvelle de la même manière l'injection le lendemain diluant 30 cent. cubes du sérum dans 270 cent. cubes d'eau physiologique, le surlendemain on donne 40 cent. cubes du sérum dans 360 cent. cubes d'eau physiologique.

Le sérum est toujours très bien supporté.

En injection sous-cutanée ou intraveineuse, son innocuité est absolue. Les accidents sériques après les injections sous-cutanées sont passagers et bénins (l'urticaire, quelquefois une éruption scarlatiniforme, certaines malades ont présenté en même temps que l'urticaire des douleurs articulaires le plus souvent peu intenses et de courte durée). Ces accidents, dans les cas observés par nous, provoquèrent toujours un choc salutaire suivi d'une chute de température immédiate et d'amélioration définitive.

Les injections intraveineuses de notre sérum sont suivies, d'habitude immédiatement, d'une très forte réaction ; frisson d'un quart d'heure à vingt minutes environ, sueurs profuses. Lorsque l'une ou l'autre manifestation apparaît, le pronostic est favorable. La défervescence se produit alors en vingt-quatre à quarante-huit heures. Le pouls tombe, sa chute précède celle de la température ou coïncide avec elle.

Les accidents sériques, après l'injection du sérum par la voie intraveineuse, sont très rares, nous ne les avons observés qu'une fois.

Sous la peau, ou en injection intraveineuse, notre sérum agit généralement tout d'abord sur la température, le pouls et l'état général.

Résultats obtenus.

Sur les 626 femmes examinées à la Clinique Baudelocque, 241 (38 p. 100) ont montré au niveau de leur col utérin du *streptocoque*. Sur ce nombre, 41 ont fait de l'infection puerpé-

rale à des degrés différents et ont été traités par notre sérum antistreptococcique.

Ces 41 cas (où nous avons eu 38 guérisons) se laissent répartir de la façon suivante :

20 cas (rupture prématurée des membranes, hémorragies pour délivrance artificielle, un cas d'avortement, deux de forceps) où nous avons institué le traitement lorsque la température rectale (trois ou quatre jours après l'accouchement) était aux environs de 39° et la dépassait et que les signes cliniques disaient le début des accidents infectieux. L'examen bactériologique des lochies montrait du streptocoque.

16 cas où la température atteignait 40° et plus ; phénomènes locaux : utérus douloureux, lochies fétides ou non, contenant des streptocoques, symptômes généraux : plusieurs frissons, pouls rapide, facies pâle, anxieux, état général grave.

5 cas de septicémie sanguine (hémoculture donnant un seul germe : streptocoque).

Dans les deux premières séries, nous avons pratiqué les injections sous-cutanées de notre sérum (60 cent. cubes pendant trois jours) et sur 36 femmes ainsi traitées nous avons eu 36 guérisons ; la défervescence de la température s'est faite rapidement (en trois-quatre jours), le streptocoque disparaissait des lochies et l'état de la malade redevenait parfaitement normal.

Dans les 5 cas où le streptocoque avait déjà franchi la barrière utérine, nous notons trois morts.

Dans l'un des cas, il s'agissait d'une femme ramenée de la ville, dont le contrôle bactériologique et le traitement (injection sous-cutanée) ont été institués tardivement (douze jours après l'accouchement), l'injection intraveineuse du sérum n'a été faite que le vingt-troisième jour de la maladie. Dans le deuxième, suivi tout au début de nos recherches, nous n'avons pu pratiquer ni l'hémoculture, ni l'injection intraveineuse de notre sérum. Le traitement sous-cutané fut insuffisant.

Le troisième cas fut traité par les injections sous-cutanées et intraveineuses de sérum, la dernière hémoculture (quatrième depuis le début de la maladie), faite chez cette femme le vingt-sixième jour de la maladie, est restée négative ; néanmoins, l'état général de la malade demeurait moyen. Rentrée chez elle, sur sa demande (six jours après son hémoculture négative), elle meurt dix jours après. Dans les deux autres cas de septicémie

sanguine une malade a reçu une seule injection intraveineuse de sérum (20 cent. cubes dans 180 cent. cubes d'eau physiologique), l'autre, trois injections successives (20, 30 et 40 cent. cubes du sérum dilué au 1/9 dans de l'eau physiologique), les deux ont guéri.

Nous reproduisons ci-dessous nos observations prises dans le service de M. le professeur Couvelaire, ainsi que deux autres de septicémie puerpérale, traitées et guéries par notre sérum et qui nous ont été communiquées obligeamment par M. le Dr Rivière (de Bordeaux) et M. le Dr Robert Dupont (de Paris). Nous mentionnerons encore brièvement que notre sérum antistreptococcique a été utilisé, avec résultat favorable, dans d'autres affections que la fièvre puerpérale, notamment : dans les cas d'érysipèle de la face, d'érysipèle du nouveau-né, de septicémie avec dermite érysipélateuse, d'ostéomyélite à streptocoque, etc...

En résumé :

Sur 626 accouchées, 241, donc plus d'un tiers, ont montré du streptocoque dans les lochies. Le streptocoque peut exister sur le col de l'utérus en dehors de toute fièvre ou accidents, mais si la température monte et que l'infection puerpérale s'installe, c'est toujours chez la femme qui a du streptocoque (hémolytique ou non hémolytique) dans ses lochies.

Le diagnostic bactériologique se montre de toute importance pour pouvoir dépister le début des accidents infectieux et instituer un traitement sérothérapique rationnel et précoce.

Les 36 femmes porteuses de streptocoques et ayant fait de la fièvre puerpérale à des degrés différents ont été traitées, dès le début de l'infection, par notre sérum antistreptococcique (en injection sous-cutanée) *sans aucun traitement local.*

Sur les 36 femmes ainsi traitées, nous avons eu 36 guérisons.

Chaque fois, lorsque, guidés par le contrôle bactériologique, fait avant tout signe d'infection, nous intervenions dès les premiers accidents caractérisés de la fièvre puerpérale, l'action du sérum amena rapidement la défervescence thermique, la sédation des symptômes infectieux, la disparition des streptocoques et la guérison.

Dans ces cas, le barrage sérique basé sur des données bactériologiques précises a empêché l'infection de diffuser et de

dépasser la sphère génitale. L'action du sérum semble ici indubitable.

Sur les sept cas de septicémie à streptocoque (hémocultures positives) cinq ont été traités par les injections intraveineuses de sérum, nous avons noté quatre guérisons et une mort. Dans les deux autres cas septicémiques, l'hémoculture n'a pas été faite. L'une des femmes a été traitée très tardivement (le vingt-troisième jour du début de l'infection) ; l'autre n'a reçu que des injections sous-cutanées du sérum. Les deux sont mortes.

Les 385 femmes, dont les lochies *ne contenaient pas de streptocoques*, n'ont pas présenté de fièvre.

Le streptocoque que nous avons si fréquemment observé chez les accouchées (dans plus d'un tiers des cas étudiés) peut susciter des réflexions d'ordre différent. D'où vient ce streptocoque ? du dehors ? ou bien existe-t-il des « porteuses de germes streptococciques » tout comme il existe des porteurs de bacilles diphtériques ?

Pourquoi le streptocoque, greffé, après l'accouchement, sur le col de l'utérus, ne produit-il aucun accident chez telle femme alors que chez telle autre il provoque de l'infection puerpérale ? Est ce la symbiose avec tels ou tels microbes qui rend ce streptocoque pathogène ? Est-ce, enfin, le terrain individuel prédisposé ou non à l'infection par une maladie antérieure (grippe, scarlatine, diphtérie, endométrite, etc...) ? Autant de questions que nous voyons se dégager de nos recherches et qui, un jour, précisées, permettront peut-être d'arracher, à cette maladie évitable qu'est l'infection puerpérale — ses derniers secrets.

Observations.

A. — Première série de vingt observations.

Observation I (Baudelocque 2028 de 1920). — Primipare, quarante et un ans. Rupture prématurée des membranes. Forceps. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°5 le cinquième jour. Trois injections de notre sérum de 60 cent. cubes chaque injection pendant trois jours ; quarante-huit heures après la température est à 37°9, défervescence progressive. Guérison.

Observation II (Baudelocque 1028 de 1920). — Primipare, vingt-trois ans. Hémorragie. Délivrance artificielle du placenta. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°2 le troisième jour. Trois injections du sérum de 60 cent. cubes chaque injection. Chute de température à 38°2, défervescence progressive ensuite. Guérison.

Observation III (Baudelocque 648 de 1920). — Primipare, vingt-six ans (Grippe à vingt-cinq ans). Le quatrième jour la température monte à 39°2. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Le septième jour, la température est à 37°4. Guérison.

Observation IV (Baudelocque 734 de 1920). — Primipare, vingt-deux ans. Avortement. Endométrite. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°2 le quatrième jour. Trois injections de notre sérum de 60 cent. cubes pendant trois jours successifs. La température oscille et se maintient toujours au-dessus de 38°. Quarante-huit heures après la dernière injection du sérum, forte réaction sérique. Trois jours après, chute progressive de température. Guérison.

Observation V (Baudelocque 701 de 1920). — Primipare, vingt ans. Escarres vulvaires. Le premier jour, température 39°1, le quatrième jour 39°5. Quatre injections du sérum de 60 cent. cubes pendant quatre jours. La dernière injection est suivie d'une violente réaction sérique. Trois jours après, chute progressive de température. Guérison.

Observation VI (Baudelocque 677 de 1920). — Primipare, trente-cinq ans. Rupture prématurée de membranes. Forceps. Délivrance artificielle pour hémorragie. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°2 le cinquième jour. Quatre injections du sérum de 60 cent. cubes pendant quatre jours. Réaction sérique violente. Chute progressive de température. Guérison.

Observation VII (Baudelocque juin 1920). — Femme accouchée chez elle. Thrombus vaginal. Evacuation de caillots. Le cinquième jour, la température est à 39°6, le huitième jour à 39°. Quatre injections du sérum de 60 cent. cubes pendant quatre jours. Chute de température en lysis. Guérison.

Observation VIII (Baudelocque 1048 de 1920). — Primipare, dix-neuf ans. Endométrite. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°9 le sixième jour. Une injection de sérum de 60 cent. cubes. Le huitième jour, la température est à 37°5. Guérison.

Observation IX (Baudelocque 724 de 1920). — Primipare, vingt et un ans. Rupture prématurée des membranes. Accouchement prématuré au cours du septième mois, fœtus mort. Le sixième jour, ascension thermique à 38°4, frisson. Une injection du sérum de 60 cent. cubes, quarante-huit heures après la température tombe à la normale. Guérison.

Observation X (Baudelocque 1118 de 1920), Primipare, vingt et un ans (Grippe en 1913). Rupture prématurée des membranes. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°3 le cinquième jour. Quatre injections du sérum de 60 cent. cubes pendant quatre jours. Le dixième jour, la température est à 38°. Défervescence progressive. Guérison.

Observation XI (Baudelocque 2040 de 1920). Primipare, trente-huit ans. Rupture prématurée des membranes. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°4 le troisième jour. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Chute de température à la normale. Guérison.

Observation XII (Baudelocque 704 de 1920). — III-pare, trente-quatre ans (Grippe il y a un an). Le septième jour, ascension thermique à 39°4. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Le neuvième jour, la température est à 37°4. Guérison.

Observation XIII (Baudelocque 835 de 1920). — Primipare, vingt ans. Rupture prématurée des membranes. Le troisième jour, la température monte à 39°4. Deux injections du sérum de 60 cent. cubes pendant deux jours. Chute de température en lysis. Le huitième jour, forte réaction sérique avec ascension thermique. Elle dure trois jours et la température revient à la normale. Guérison.

Observation XIV (Baudelocque 1024 de 1920). — Primipare, vingt-cinq ans. Membranes déchirées incomplètes. Le deuxième jour, ascension thermique brusque à 39°3, le jour suivant à 39°8. La température se maintient au-dessus de 38° pendant six jours, le septième jour elle est à 38°6. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Chute de température en lysis. Guérison.

Temps
Pouls

Courbe 1.

Observation XV (Baudelocque 1045 de 1920). — Primipare, vingt ans (Grippe il y a un an). Membranes déchirées incomplètes. Ascension thermique progressive jusqu'à 38°7 le sixième jour. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Le dixième jour la température tombe à 37°4. Le quatorzième jour, une nouvelle ascension thermique progressive, jusqu'à 40° le dix-huitième jour. Deux injections du sérum de 60 cent. cubes pendant deux jours. Défervescence progressive. Guérison.

Observation XVI (Baudelocque 696 de 1920). — II-pare, vingt-deux ans. Ascension thermique progressive jusqu'à 38°8 le quatrième jour. Une injection du sérum de 60 cent. cubes. Défervescence progressive. Guérison.

Observation XVII (Baudelocque 792 de 1920). — Primipare, vingt-cinq ans. La température monte progressivement jusqu'à 39° le sixième jour. Deux injections du sérum de 60 cent. cubes pendant deux jours. En 24 heures, la température redevient normale. Guérison.

Observation XVIII (Baudelocque 815 de 1920). — (Grippe en 1918). Rupture prématurée des membranes. Ascension thermique progressive jusqu'à 39°5 le sixième jour. Deux injections du sérum de 60 cent. cubes pendant deux jours. Le huitième jour, la température tombe à 38°4, défervescence progressive. Guérison.

Observation XIX (Baudelocque 2082 de 1920). — Lucie B..., primipare, vingt et un ans. Accouchement spontané à terme le 2 décembre. Rupture des membranes spontanée, tempestive, liquide amniotique verdâtre, déchirure de la fourchette.

L'enfant mort-né, femme syphilitique. Le lendemain de l'accouchement, les lochies examinées montrent du *streptocoque* (culture pure), la température est à 38°8 (pouls 110).

Pendant quatre jours la température oscille au-dessus de 38°, le cinquième jour après l'accouchement, elle monte à 39°6 (pouls 116).

Trois injections de notre sérum antistreptococcique V sont faites à ce moment, de 60 cent. cubes chaque.

La température descend progressivement, suivie de la chute du pouls.

Le 13 décembre, le quatrième jour après la dernière injection du sérum, la température est à 37°5 (pouls 80).

Pas d'accidents sériques.

Sortie le 14 décembre (Courbe 1).

Observation XX (Baudelocque 814 de 1920). — Eloïse G..., trente-six ans. Troisième gestation.

Le premier et le deuxième accouchement sont spontanés à terme, enfants vivants, bien portants.

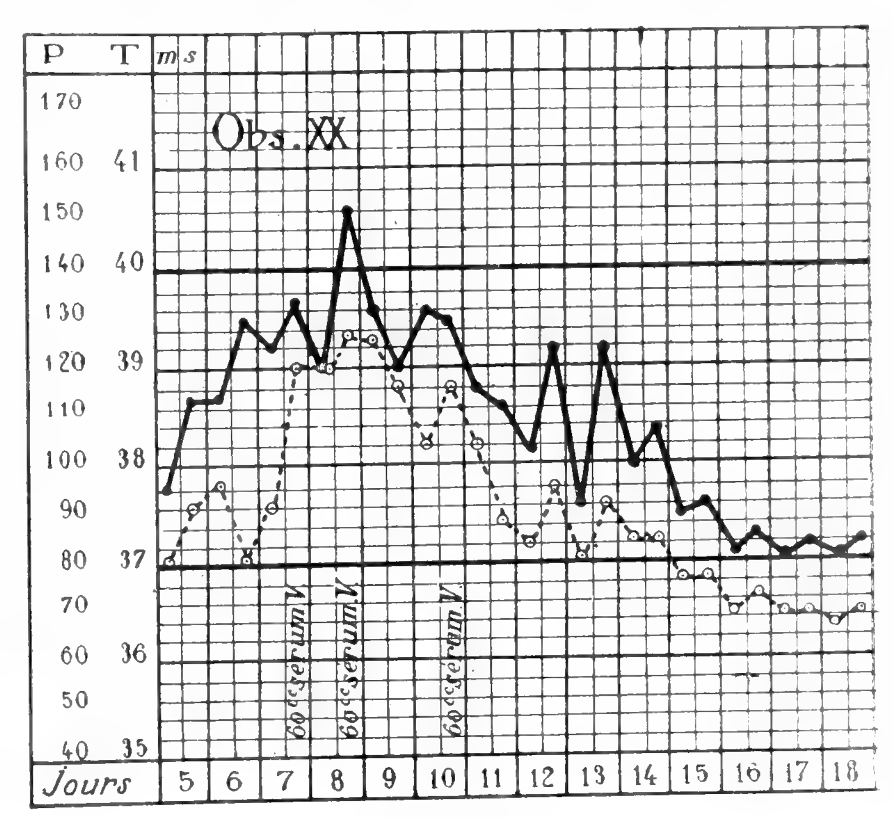
Grippe au cours du troisième mois de la gestation actuelle.

Rupture prématurée des membranes. Accouchement spontané au cours du huitième mois, le 10 mai.

Endométrite hémorragique.

Fœtus, poids 2.000 gr. Mort presque aussitôt après l'expulsion.

Le placenta reste non décollé, délivrance naturelle se fait tardivement, précédée d'une hémorragie (pouls 110; après la délivrance, de suite 80).



Courbe 2.

Les lochies examinées le lendemain de l'accouchement montrent de nombreux *streptocoques*; la température est à 37°4.

Les jours suivants, la température monte progressivement et, le sixième jour après l'accouchement, elle est à 39°5, le jour suivant à 39°7 (pouls 120).

Lochies fétides. Utérus mou que l'on ne peut délimiter à la palpation. A ce moment, on pratique une première injection de notre sérum antistreptococcique V (60 cent. cubes).

Le lendemain, la température est encore à 40°6 (pouls 125). Deuxième injection du sérum est pratiquée, 60 cent. cubes. Le lendemain, chute de température à 39° (pouls 108).

On fait une troisième injection du sérum de 60 cent. cubes, chute du pouls à 80, température 38°6. Deux fois encore elle oscille à 39° et descend progressivement ensuite.

Pas d'accidents sériques. Sortie le 3 juin (Courbe 2).

B. — Deuxième série de seize observations.

Observation XXI (Baudelocque 1100 de 1920). — Marthe M..., trente-deux ans. II-pare. Première gestation, crise d'éclampsie au cours dutravail.

Le 1er juillet, accouchement spontané. Le jour de l'accouchement la température est à 38° (pouls 100).

L'examen bactériologique des lochies fait le lendemain de l'accouchement montre du *streptocoque* (en culture pure).

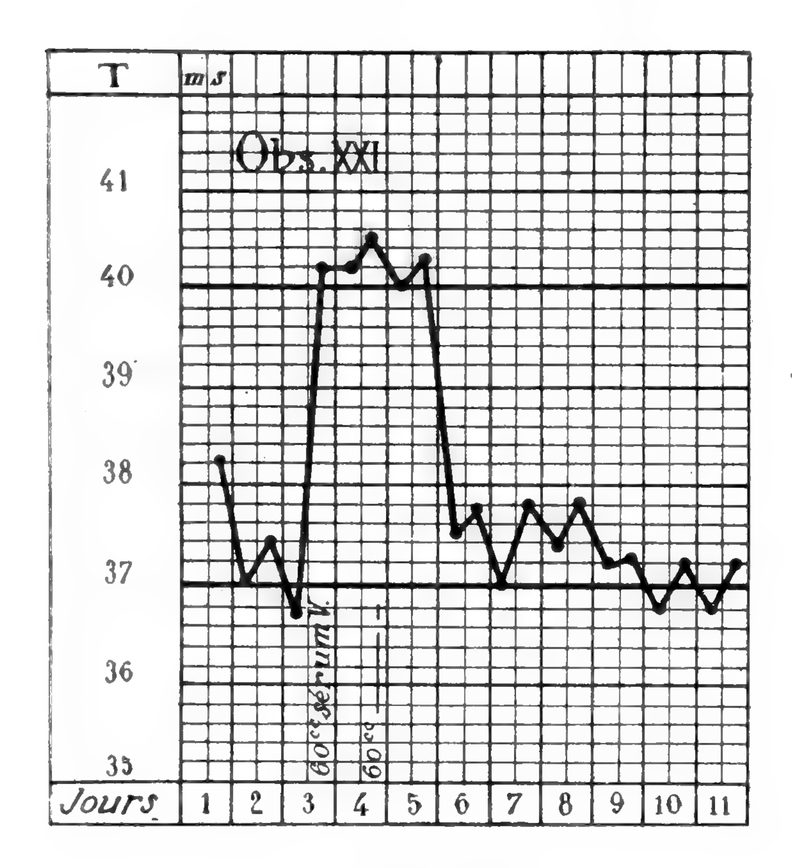
Le troisième jour, après l'accouchement, la température monte à 40°2, le jour suivant à 40°3. Utérus dur, douloureux. Deux injections de notre sérum antistreptococcique V sont faites de 60 cent. cubes chaque.

En quarante-huit heures, chute de température à 37°4 le matin, 37°8 le soir, le pouls suit la température qui se maintient depuis à la normale.

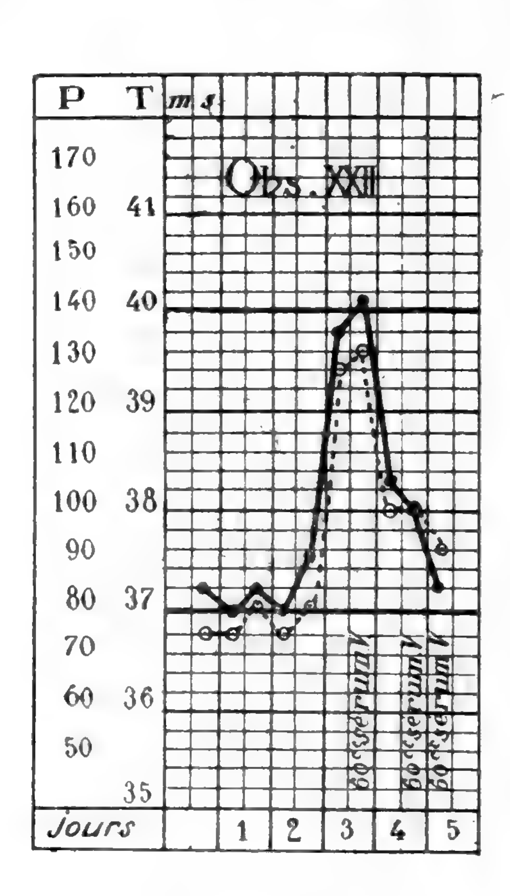
Pas d'accidents sériques.

Sortie le 3 août (Courbe 3).

Observation XXII (Baudelocque 1121 de 1920). — Colette S..., vingt ans.



Courbe 3.



Courbe 4.

Primipare. Accouchement spontané à terme (le 5 juillet). L'examen bactériologique des lochies montre du *streptocoque*.

Trois jours après l'accouchement, la température monte à 39°8 le matin (pouls 128) et à 40°1 le soir (pouls 130).

On fait à ce moment l'injection de notre sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes, suivie de deux autres, même dose pendant les jours successifs. Après la première injection du sérum, chute de température à 38°3 (pouls 100), le jour suivant elle est à 37°2 (pouls 90).

Quarante-huit heures après la dernière injection du sérum commence un érythème sérique très intense, de la face, des jambes, du ventre, des bras. La température monte progressivement à ce moment, pendant les cinq jours qu'a duré la réaction, jusqu'à 40°. Vingt-quatre heures après la température tombe à 38°2, oscille pendant quelques jours encore et redevient ensuite normale.

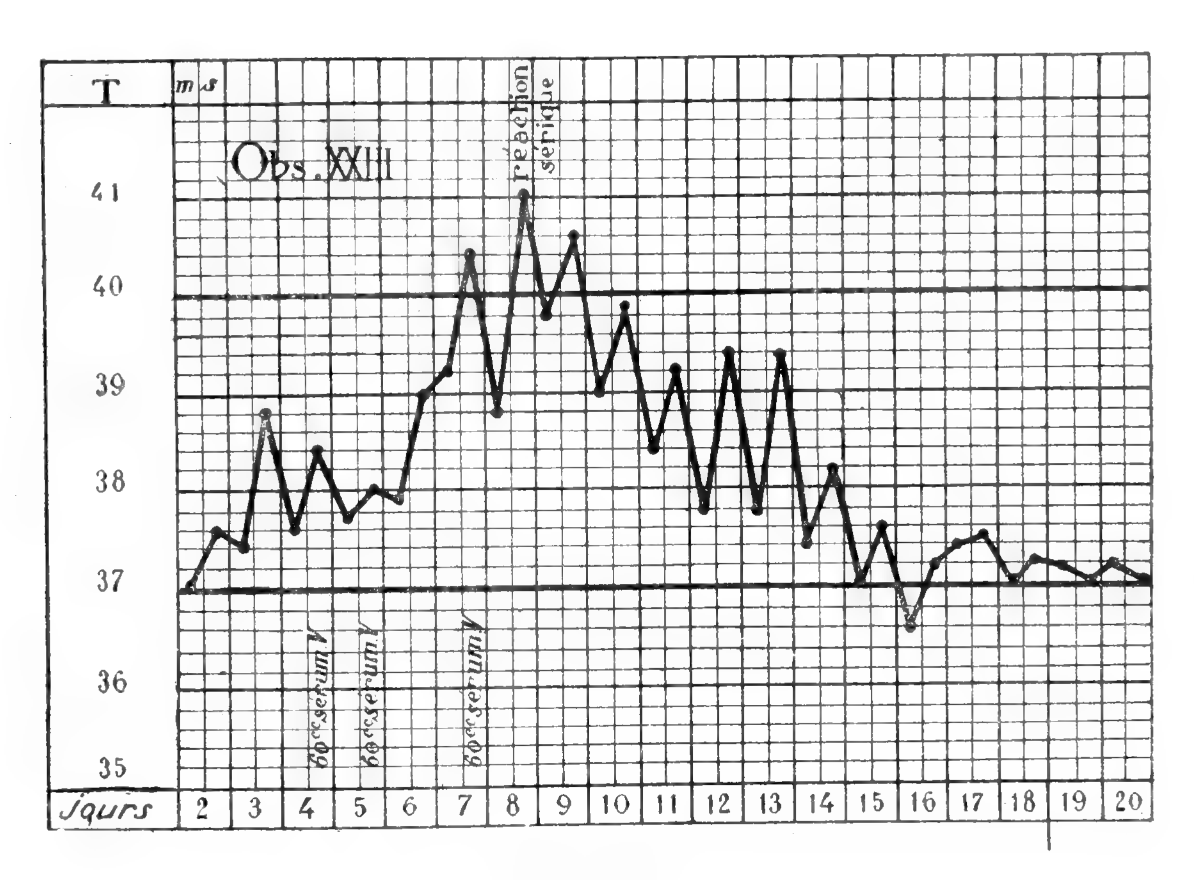
Sortie le 3 août (Courbe 4).

Observation XXIII (Baudelocque 739 de 1920). — Suzanne D..., dix-neuf ans. Primipare. Antécédents : bartholinite il y a sept mois ne durant que quelques jours, récidive de bartholinite il y a quinze jours.

Eczéma pendant les derniers trois mois de la grossesse. Hyper-sécrétion vaginale. Accouchement spontané à terme le 29 avril.

Eraillure de la fourchette, la femme refuse le traitement.

Les lochies examinées montrent de nombreux *streptocoques* (streptocoque hémolytique après quarante-huit heures, ne coagule pas le lait). Trois jours après l'accouchement la température monte à 38°8. Utérus douloureux au niveau du bord droit. Une première injection de notre sérum antistreptococcique V de 30 cent. cubes est faite le jour même de l'accouchement, elle est suivie de trois autres injections de 60 cent. cubes chaque. La température



Courbe 5.

continue de monter progressivement, elle est de 40°4 le jour de la troisième injection. Le lendemain de la dernière injection du sérum la malade fait une réaction sérique très forte (urticaire, éruption scarlatiniforme), la température monte à 41°.

Vingt-quatre heures après, la température descend progressivement en lysis, et devient ensuite normale. Elle est de 37°6 le 14 mai.

Sortie le 21 mai (Courbe 5).

Observation XXIV (Baudelocque 1107 de 1920). — Armance N..., vingt et un ans. Primipare. Accouchement spontané à terme le 3 juillet. Température : 38°1, elle redescend les jours suivants et se maintient normale jusqu'au 8 juillet.

Le 8 juillet, la température remonte à 38°.

Le 9 juillet, frisson dans la nuit.

Le 10 juillet, la température est à 39°2 le matin (pouls 115) et 40° le soir (pouls 120).

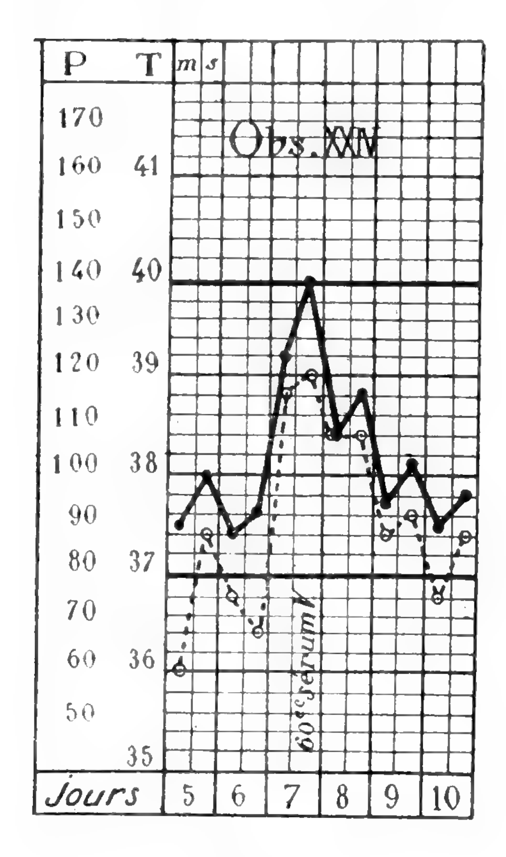
Utérus douloureux, lochies fétides à l'examen bactériologique donnent du

streptocoque (légèrement hémolytique presque pur, en très grande majorité, coagule le lait sans rétraction latérale).

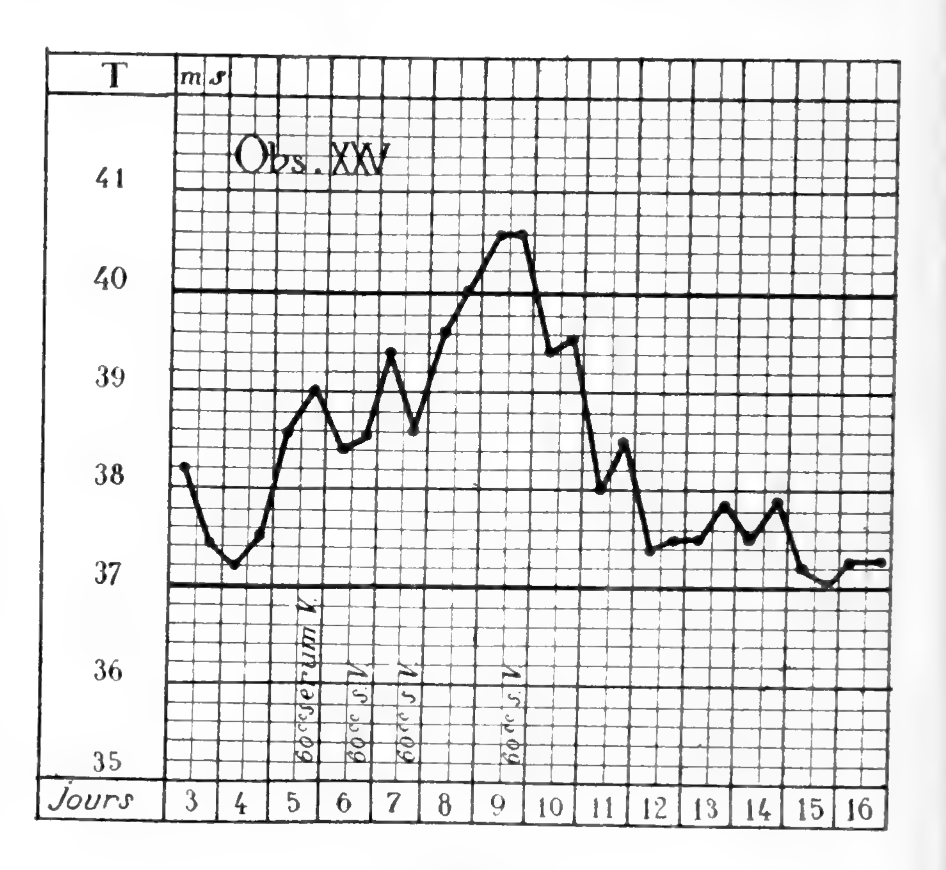
Le 10 juillet, injection de notre sérum antistreptococcique V (60 cent. cubes). Le lendemain la température tombe à 38°8, le surlendemain à 38°1 et le jour suivant à 37°8 (pouls 90).

Sortie le 14 juillet (Courbe 6).

Observation XXV (Baudelocque 738 de 1920). — Maria B..., trente-sept ans, 7e gestation. Accouchement spontané à terme le 29 avril. Rupture



Courbe 6.



Courbe 7.

prématurée des membranes. L'examen bactériologique des lochies prélevées le jour de l'accouchement montre de nombreux *streptocoques*, la température est à 37°4.

Le troisième jour, la température monte à 38°2 et les jours suivants à 39°.

A ce moment, on commence l'injection de notre sérum antistreptococcique V. Quatre injections successives de 60 cent. cubes chaque.

A la dernière injection la température est à 40°6 (éruption sérique, une très forte réaction, frisson) et quarante-huit heures après, la température tombe à 37°5 et se maintient normale.

Sortie le 18 mai (Courbe 7).

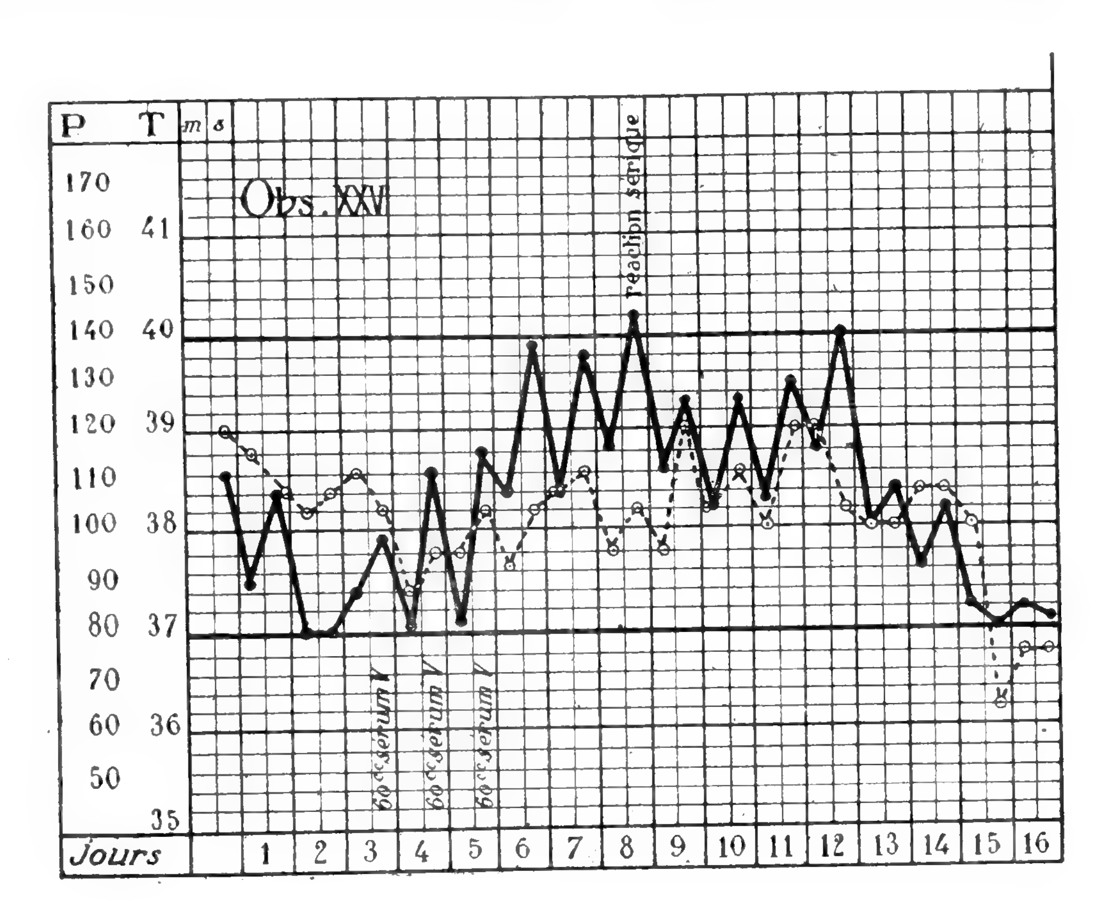
Observation XXVI (Baudelocque 717 de 1920). — Jeanne P..., dix-huit ans. Primipare. Antécédents : congestion pulmonaire à cinq ans. Grippe en 1919 (bronchite consécutive, durée deux mois). Palpitations cardiaques, fréquentes. Pas de rhumatisme.

Accouchement prématuré le 25 avril au cours du sixième mois d'un fœtus pesant 1.630 grammes. Rupture prématurée des membranes cinq jours avant l'accouchement. Placenta adhérent au niveau de la corne gauche et du fond utérin ; délivrance artificielle très difficile par suite de la rétraction du segment inférieur. Le lendemain de l'accouchement, la température est à 38°4 (pouls 110), lochies fétides.

L'examen bactériologique montre du *streptocoque* en très grand nombre (moyennement hémolytique). En six jours, la température monte jusqu'à 39°9.

Trois injections de notre sérum antistreptococcique V, de 60 cent. cubes chaque.

Une très forte réaction s'ensuit; ascension thermique à 40°2, éruption généralisée intense, douleurs articulaires des membres inférieurs et supérieurs. Quatre jours après, la température tombe à 38°4. le jour suivant à 38°2, puis à 37°, et se maintient normale ensuite.



Courbe 8.

Sortie le 29 mai (Courbe 8).

Observation XXVII (Baudelocque 813 de 1920). — Marie M..., vingt-deux ans. Primipare. Rupture prématurée des membranes le 10 mai en ville. Accouchement spontané au cours du neuvième mois.

Les lochies examinées le lendemain de l'accouchement montrent du *streptocoque*. La température est à 37°6.

Les jours suivants elle monte progressivement et le neuvième jour atteint 40°4 (pouls 140).

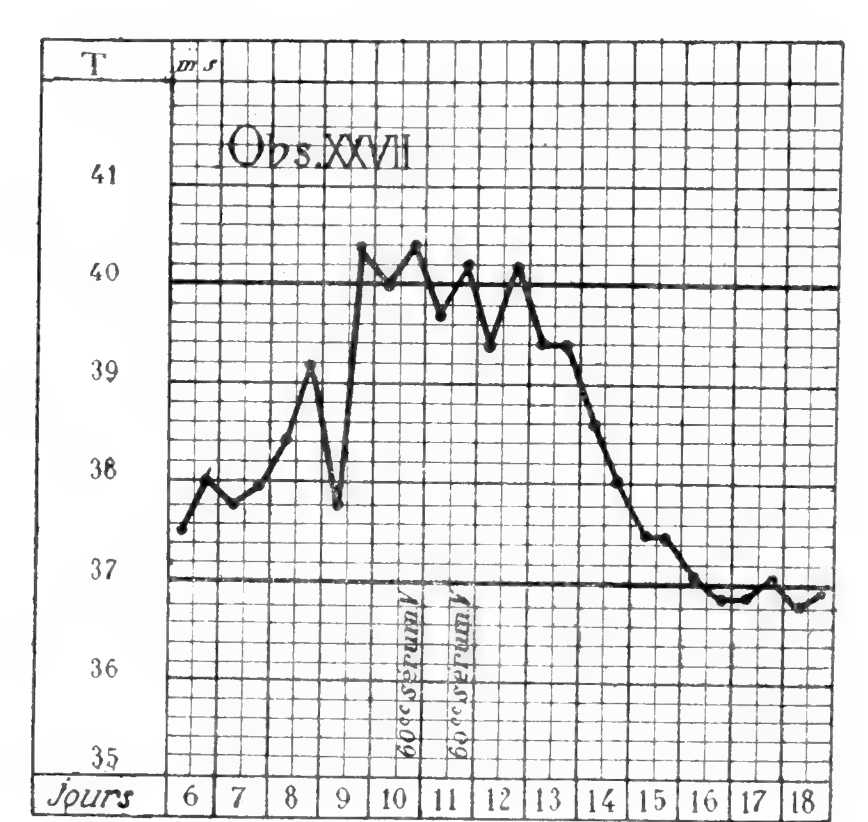
Utérus douloureux au niveau de son bord droit, lochies fétides. La malade passe à l'isolement le 20 mai.

Le 21 mai, première injection de notre sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes (température : 40°4), suivie le lendemain d'une autre de 60 cent. cubes.

Forte réaction sérique avec éruption et douleurs articulaires au niveau des membres inférieurs. Température : 40°2. Le surlendemain de la dernière injection, la température tombe à 39°4, le jour suivant à 38°1, puis à 37°5 et se maintient normale.

Sortie le 31 mai (Courbe 9).

Observation XXVIII (Baudelocque 691 de 1920). — Hélène T..., vingt et un ans. Primipare. Accouchement prématuré au cours du septième mois le 20 avril.



Courbe 9.

Durée totale du travail, quatorze heures.

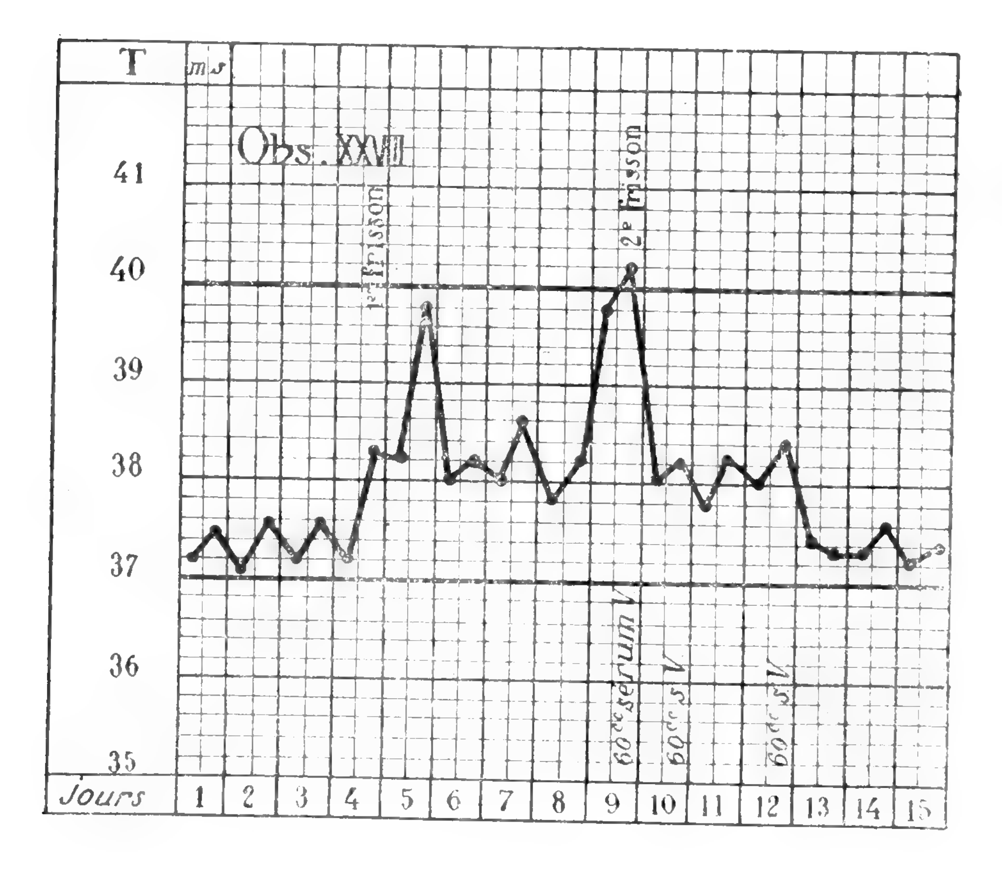
Extraction du placenta par traction et expression combinées.

Le lendemain de l'accouchement la température est de 37°2.

Le quatrième jour, un frisson et le lendemain la température atteint 39°8.

Lochies fétides, à l'examen bactériologique montrent du *streptocoque* (moyennement hémolytique).

Utérus douloureux, dévié à droite. Trois jours se passent sans accident, mais le 29 avril, nouveau frisson, la température monte à 40°2 (pouls 104). Langue saburrale, douleur dans la partie latérale de la fosse iliaque et du flanc gauche. Le 29 avril, première injection de notre sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes.



Courbe 10.

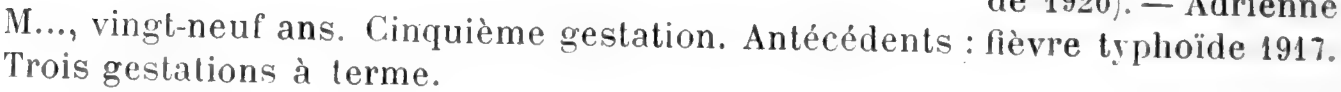
Le lendemain, la température tombe à 38° le matin, 38°2 le soir.

Expulsion des débris. — Les annexes gauches douloureux le jour suivant. Deux nouvelles injections de sérum sont pratiquées de 60 cent. cubes chaque.

En trois jours la température devient normale.

Sortie le 6 mai (Courbe 10).

Observation XXIX (Baudelocque 2068 de 1920). — Adrienne


M..., vingt-neuf ans. Cinquième gestation. Antécédents : fièvre typhoïde 1917. Trois gestations à terme.

En 1919, avortement de cinq mois, suites de l'avortement normales.

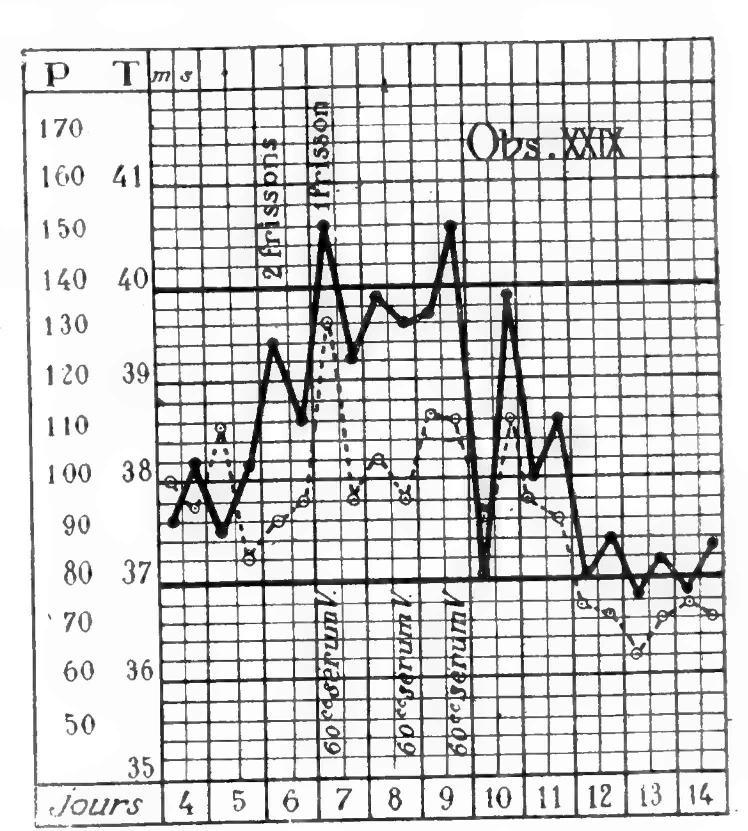
Le 28 novembre 1920, rupture prématurée des membranes. Fibrome volumineux. Le 29 novembre, accouchement spontané. Délivrance artificielle, hémorragie, membranes déchirées.

L'examen bactériologique des lochies, fait le lendemain de l'accouchement, montre du *streptocoque* (non hémolytique, sans action sur le lait, virulent pour la souris), la température est à 38°4, pouls 100.

Pendant les quatre jours suivants, la température est au-dessus de 38°, pouls oscille entre 100-110-120.

Le sixième jour, après l'accouchement, la température monte à 39°4, deux grands frissons dans la journée.

Le septième jour, 6 décembre, un nouveau frisson, la température est à 40°6 (pouls 130). On pratique, à ce moment, la première injection de 60 centimètres cubes de notre sérum antistreptococcique V, suivie des deux autres, même dose.



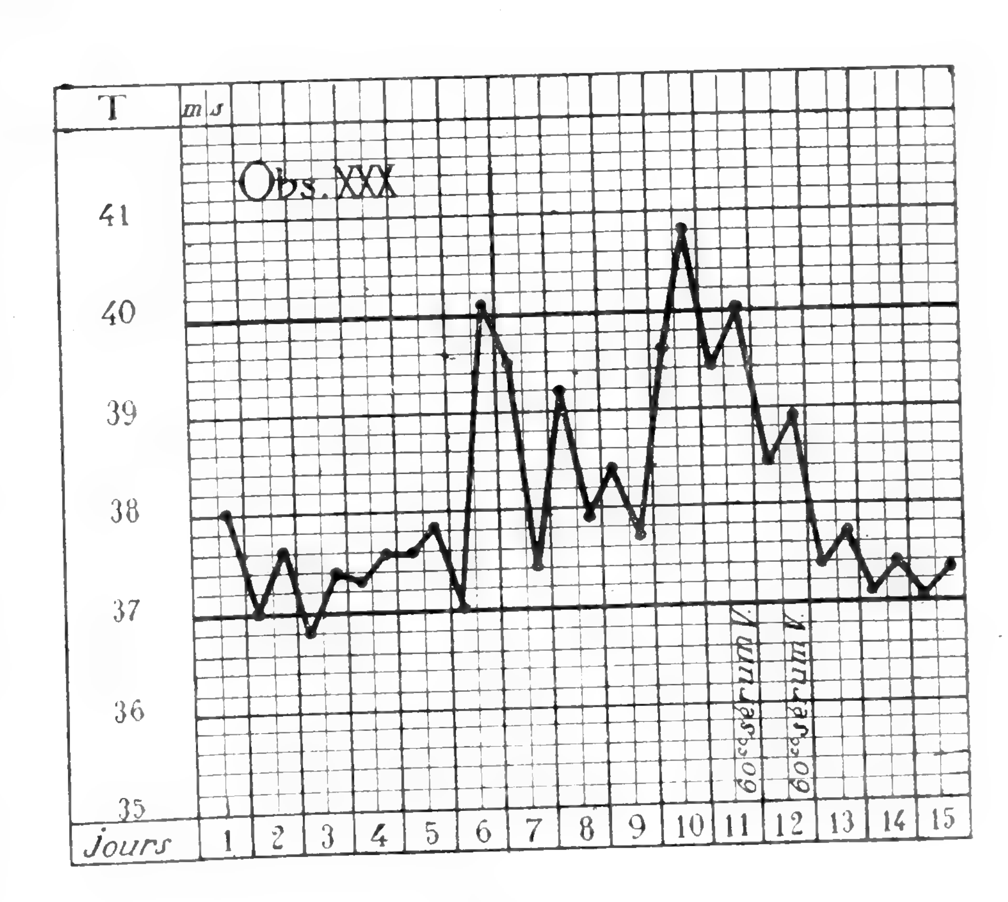
COURBE 11.

Le 8 décembre, à la dernière injection du sérum, la température est de 40°6 ; le 9 décembre, elle est à 39°9 ; le 10 décembre, elle est à 38°6 ; le 11 décembre, elle est à 37°4 et se maintient ensuite normale.

Le pouls suit la chute de la température.

L'hémoculture, pratiquée le 6 décembre, est restée négative.

Sortie en bon état le 15 décembre (Courbe 11).



COURBE 12.

OBSERVATION XXX (Baudelocque 962 de 1920). — Eléonore C..., trente-trois ans, deuxième gestation (première gestation : avortement de cinq mois).

Accouchement à terme (excès de liquide) le 7 juin.

Rupture des membranes spontanée et précoce.

Le lendemain de l'accouchement, la température est à 38°. Périphlébite face interne de la cuisse gauche.

L'examen bactériologique des lochies, fait à ce moment, n'a pas montré de streptocoques et la température le lendemain redevient normale et se maintient telle pendant quatre jours.

Le cinquième jour, le 12 juin, elle monte brusquement, 40°1 (pouls 120).

Utérus gros, dur et douloureux, céphalée.

Les lochies sont réexaminées à ce moment et montrent du *streptocoque* (légèrement hémolytique et coagule le lait avec une très forte rétraction latérale après vingt-quatre heures) en très grand nombre presque pur.

Le 16 juin, une nouvelle ascension thermique à 40°8 (pouls 130).

La malade passe à l'isolement où on lui fait une première injection du sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes, suivie d'une seconde le lendemain, même dose.

La température, étant à 40°, descend à 38°9, et vingt-quatre heures après la deuxième injection elle est de 37°4.

Sortie le 23 juin (Courbe 12).

Observation XXXI (Baudelocque 2124 de 1920). — Yvonne F..., vingt sept ans. Primipare. Accouchement spontané le 8 décembre, hypersécrétion vaginale.

Le lendemain de l'accouchement, la température est à 38°3 (pouls 90).

L'examen bactériologique des lochies montre du *streptocoque* (en culture pure).

Le huitième jour après l'accouchement, la température monte brusquement à 39°4 et le jour suivant à 40°6 (pouls 115).

Lochies fétides. Douleur dans le bas-ventre du côté droit.

On pratique une première injection de notre sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes suivie de deux autres, même dose.

La température de 40°6 descend progressivement à 40°2, 39°2, 38°9, 38°4, 38°2, 37°8.

Le quatrième jour après la dernière injection du sérum, la température remonte brusquement à 39°5 et correspond à une réaction sérique généralisée (éruption, œdème de la partie postérieure du pharynx); cette dernière terminée, la température tombe à la normale et se maintient telle (Courbe 13).

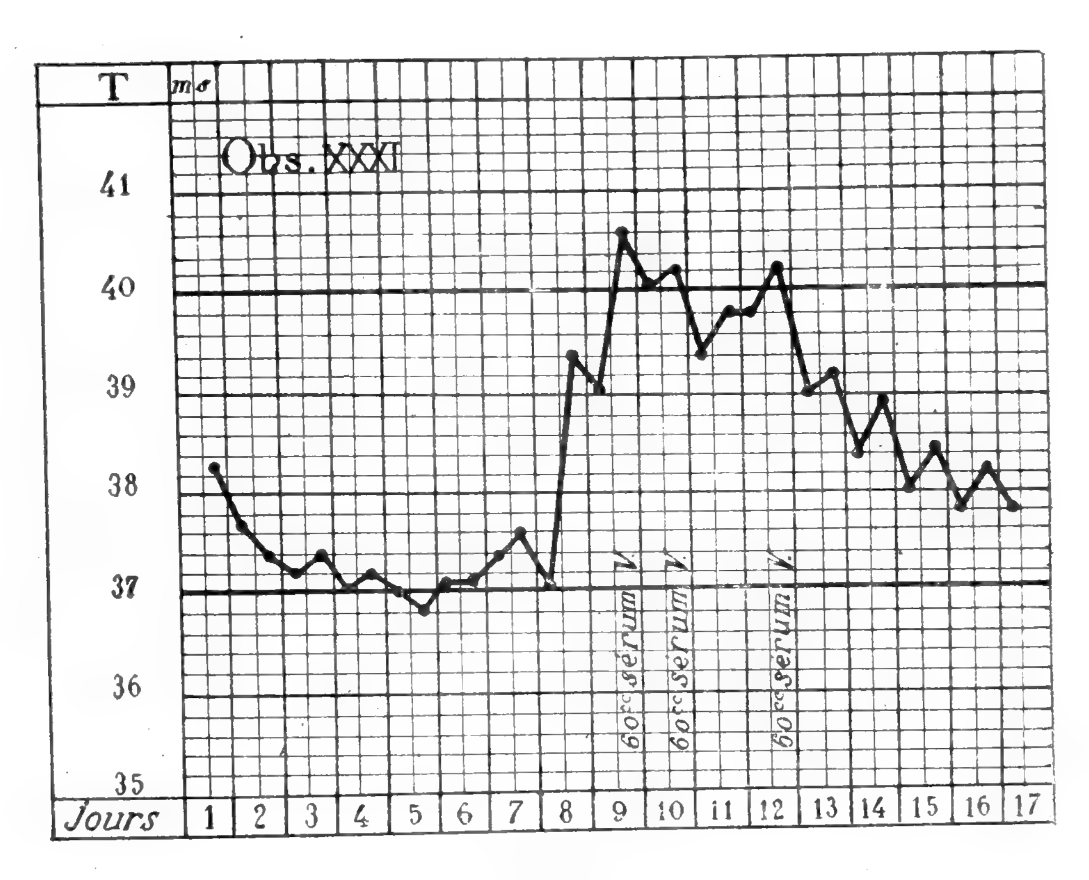
Observation XXXII (Baudelocque 1990 de 1920). — Primipare, vingt ans. Ascension thermique progressive jusqu'à 40°2 le cinquième jour. Redevient normale pendant deux jours. Le huitième jour remonte brusquement à 40°2. Trois injections du sérum de 60 cent. cubes pendant trois jours. Le neuvième jour, chute de température à 36°9. Guérison.

Observation XXXIII (Baudelocque 1053 de 1920). — II-pare, trente-deux ans. Le troisième jour, ascension thermique brusque à 40°2. Une injection de sérum de 60 cent. cubes. Le cinquième jour, la température est à 37°4. Guérison.

Observation XXXIV (Baudelocque 1122 de 1920). — Primipare, vingt ans. Le quatrième jour, ascension thermique brusque à 39°8. Le lendemain à 40°. Diarrhée. Trois injections du sérum de 60 cent. cubes pendant trois jours. Septième jour, la température est à 37°5. Guérison.

Observation XXXV (Baudelocque 810 de 1910). — Primipare, seize ans. Le deuxième jour montée brusque de température à 40°9, le jour suivant à 40°3. Trois injections du sérum de 60 cent. cubes pendant trois jours. Le sixième jour, la température est à 38°5, défervescence progressive. Guérison.

Observation XXXVI (Baudelocque 1160 de 1920). — II-pare, 29 ans. Rupture prématurée des membranes. Basiotripsie, double déchirure du col. Durée du travail, quarante-neuf heures. Délivrance artificielle, perte de sang abondante. Le troisième jour, ascension thermique brusque à 40°2, femme agitée.



Courbe 13.

Deux injections du sérum de 60 cent. cubes pendant deux jours. Le cinquième jour, chute de température à 37°6. Guérison.

C. — Troisième série (septicémies sanguines, hémocultures positives).

Observation XXXVII (Baudelocque 1001 de 1920). — Septicémie puerpérale. Streptocoque et gonocoque dans les lochies. Streptocoque dans le sang. Une injection intraveineuse de sérum antistreptococcique V. Guérison.

Vve M..., trente-deux ans, X-pare. Antécédents : Rhumatisme articulaire aigu à treize ans (première crise), deuxième crise après le deuxième accouchement, troisième crise le 7 juin, il y a huit jours.

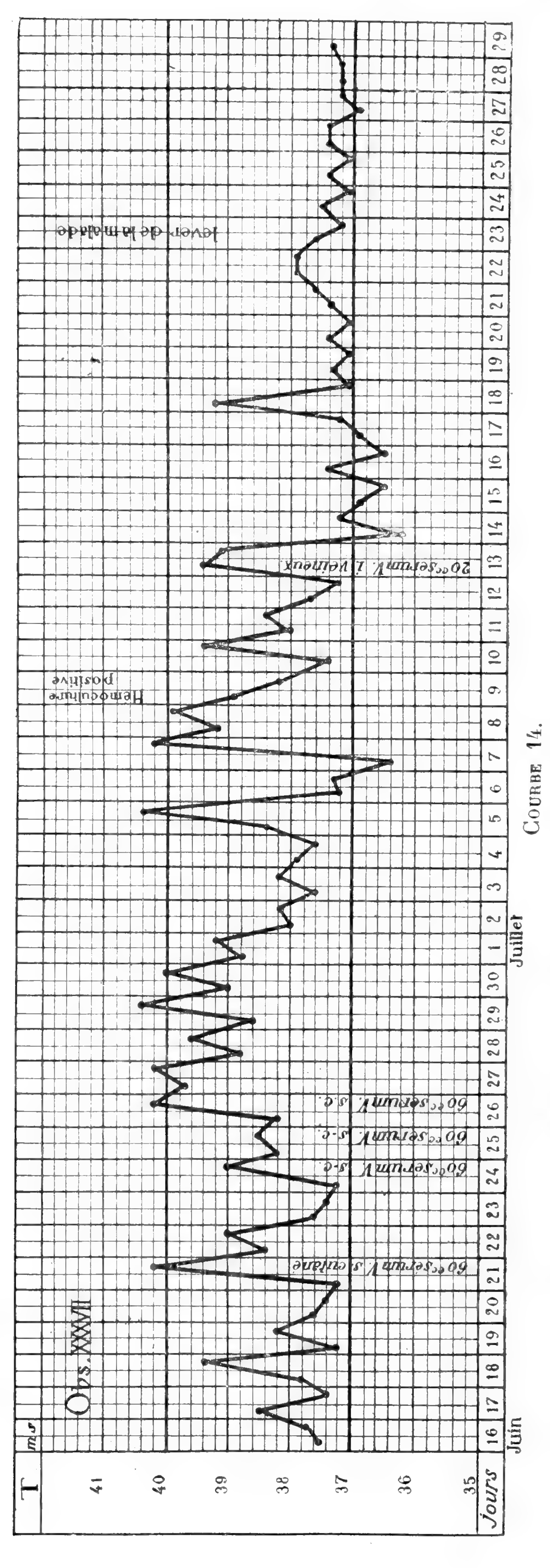
Quatre avortements de six semaines à quatre mois.

Six accouchements à terme, enfants vivants.

Le 16 juin, accouchement spontané au cours du huitième mois.

Le lendemain de l'accouchement, la température est à 38°6 (pouls 100). La malade, qui a déjà eu plusieurs crises de rhumatisme, se plaint de douleurs au niveau des deux genoux et du bras droit.

Les lochies examinées le 17 juin montrent du *streptocoque* abondant (associé au gonocoque).



Courbe 14.

Le troisième jour après l'accouchement, la température est à 39°4 et le sixième jour, le 21 juin 1920, remonte à 40°2.

La femme se plaint de nouveau de douleurs au niveau des deux genoux et des poignets, pas de dyspnée ni d'essoufflement. Le 24 juin au soir, essoufflement, angoisse, palpitations. Température : 39°. On fait quatre injections de notre sérum antistreptococcique V sous la peau, de 60 c. c chaque injection.

Après la dernière injection du sérum, la température oscille toujours entre 40°2 et 40°, le pouls se maintient à 80.

Le 29 juin, la malade se plaint de la gorge, la langue est rouge, température : 40°4, un peu d'éruption sérique généralisée et les jours suivants la température tombe à la normale pour remonter trois jours après de nouveau à 40°4 (pouls 120).

Nous sommes le 5 juillet.

La malade paraît fatiguée, répond mal aux questions posées, se plaint toujours d'avoir froid.

A partir du 5 juillet, grandes oscillations thermiques : le matin 37°2, le soir 40°. L'examen des lochies refait le 6 juillet montre toujours du streptocoque.

Le 8 juillet, malade agitée, tendance au subdélire, teint blême, tachycardie très marquée, langue rouge et sèche, pouls petit, ventre douloureux, diarrhée rebelle (Température 39°9 pouls 116).

Le 9 juillet, une hémoculture est pratiquée et montre du *streptocoque* (non hémolytique et non virulent pour les souris).

Le 12 juillet, malade très somnolente, très affaiblie, subdélirante, semble profondément intoxiquée, diarrhée continue.

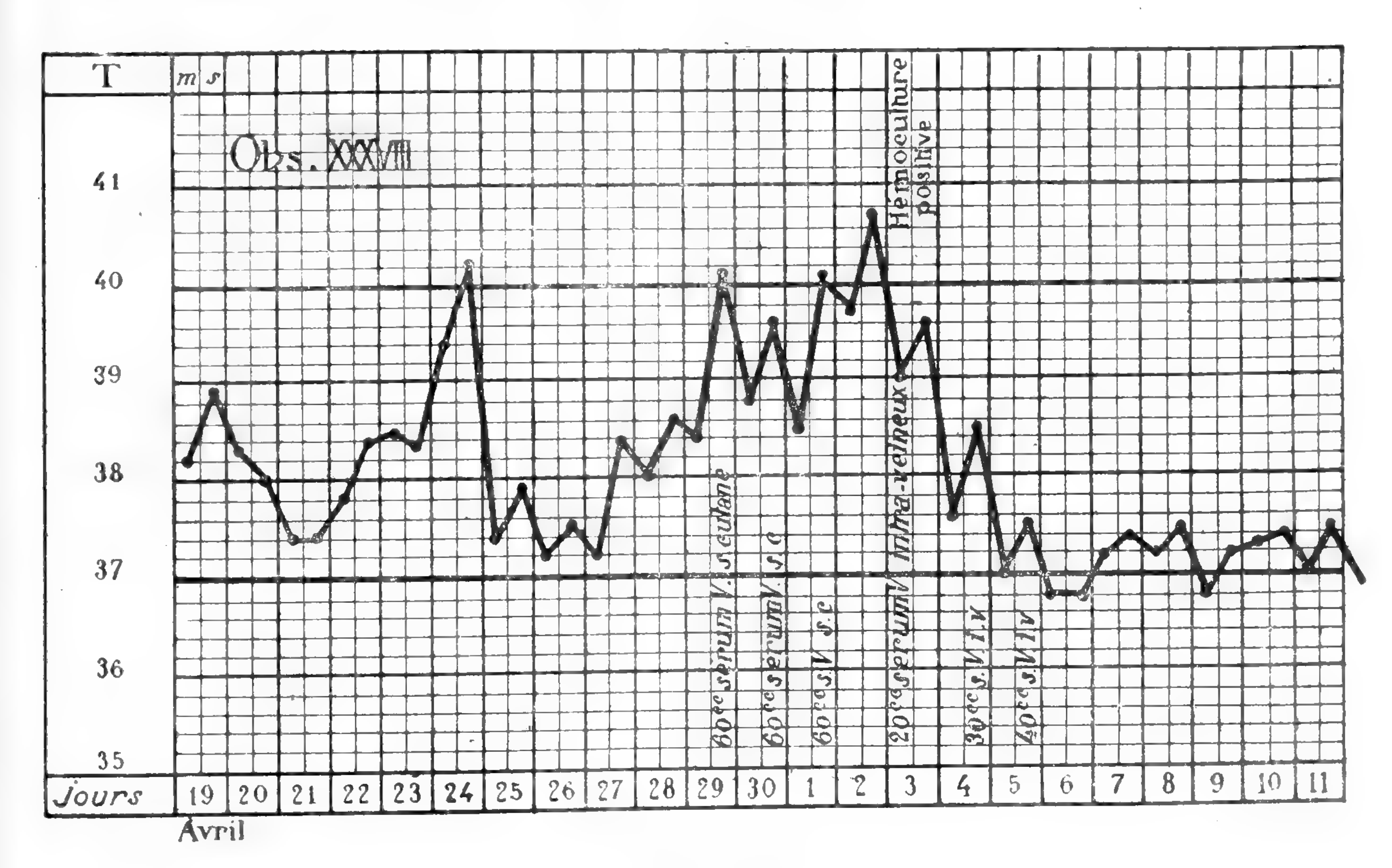
Le 13 juillet, le matin, la température est de 39°4, état général mauvais, on pratique l'injection intraveineuse de notre sérum antistreptococcique V (20 cent. cubes dans 180 cent. cubes d'eau physiologique). Un quart d'heure après l'injection du sérum, grand frisson durant vingt minutes, claquement des dents, la malade s'endort après.

Le lendemain, température matin, 36°2, soir 37°2.

Le 15 juillet, température matin, 36°9, soir, 36°5.

Le 16 juillet, température matin, 37°4, soir, 36°4.

L'état général, considérablement amélioré, nettement transformé. La malade s'alimente assez abondamment, n'a plus de diarrhée, langue humide, le teint se recolore, esprit plus présent.



Courbe 15.

Le 17 juillet, une petite poussée encore à 39°2 et depuis la température se maintient normale. Levée le 23 juillet.

État général parfait. Sort guérie le 31 juillet (Courbe 14).

Observation XXXVIII (Baudelocque avril 1921). — Septicémie puerpérale, streptocoque dans le sang. Trois injections intraveineuses du sérum antistreptococcique V. Guérison.

Alexandrine F..., accouchée en ville le 18 avril, rentre à l'isolement de la clinique Baudelocque le 29 avril pour la bronchite des deux poumons.

La température est 40°2, mais elle redevient normale le lendemain.

Le 28 avril, expulsion spontanée d'un caillot (volume d'une orange).

La température monte à 40°1 (pouls 118).

Utérus légèrement douloureux.

Le 29 avril, l'injection sous-cutanée de 60 cent. cubes de notre sérum V, suivie des deux autres injections pendant trois jours de suite.

La température se maintient toujours aux environs de 40°.

Le 2 mai, elle est à 40°7.

L'hémoculture pratiquée donne du *streptocoque* pur (non hémolytique qui ne rétracte pas le lait, virulent pour la souris).

Le 3 mai, on fait l'injection intraveineuse du sérum V (20 cent. cubes dans 180 cent. cubes d'eau physiologique), la température était à 39°6.

Une demi-heure après l'injection, la malade fait un frisson qui a duré trente minutes environ, transpiration abondante.

Le lendemain, chute de température à 38°5 (pouls 80).

On renouvelle l'injection intraveineuse (30 cent. cubes de sérum dans 270 d'eau physiologique), un nouveau frisson après l'injection, transpiration, sommeil après le frisson jusqu'au lendemain.

Le surlendemain, température à 37°5, on fait une troisième injection intraveineuse (40 cent. cubes de sérum dans 360 cent. cubes d'eau physiologique).

La température descend régulièrement en lysis, et se maintient normale depuis.

Sept jours après la dernière injection intraveineuse du sérum, la malade fait une réaction sérique, l'éruption scarlatiniforme aux deux membres inférieurs avec des douleurs articulaires, la température remonte à 39° pendant deux jours, et redevient ensuite normale.

Sortie le 21 mai, état parfait. (Courbe 15).

Observation XXXIX (Baudelocque 2167 de 1920-1921). — Septicémie puerpérale. Le streptocoque dans le sang. Sept injections intraveineuses de 20 cent. cubes chaque du sérum V. Quatrième hémoculture pratiquée le vingt-sixième jour de la maladie est enfin négative. Sortie le 27 janvier sur sa demande et morte dix jours après, chez elle.

Joséphine B..., quarante-trois ans, primipare.

Antécédents : rougeole, fièvre typhoïde à vingt-trois ans, grippe en 1918, un fibrome de la grosseur d'un œuf au niveau de la corne droite.

Accouchement spontané le 16 décembre, délivrance artificielle pour hémorragie.

Trois jours après l'accouchement, un frisson dans la nuit, température 39°1, pouls 120. Douleur spontanée généralisée de l'abdomen se propageant à la région lombaire et vomissements, glace sur le ventre.

La malade passe à l'isolement.

Les lochies examinées le lendemain de l'accouchement ont montré du streptocoque en culture pure (non hémolytique).

Le 20 décembre, on fait pendant trois jours trois injections de 60 cent. cubes de sérum V.

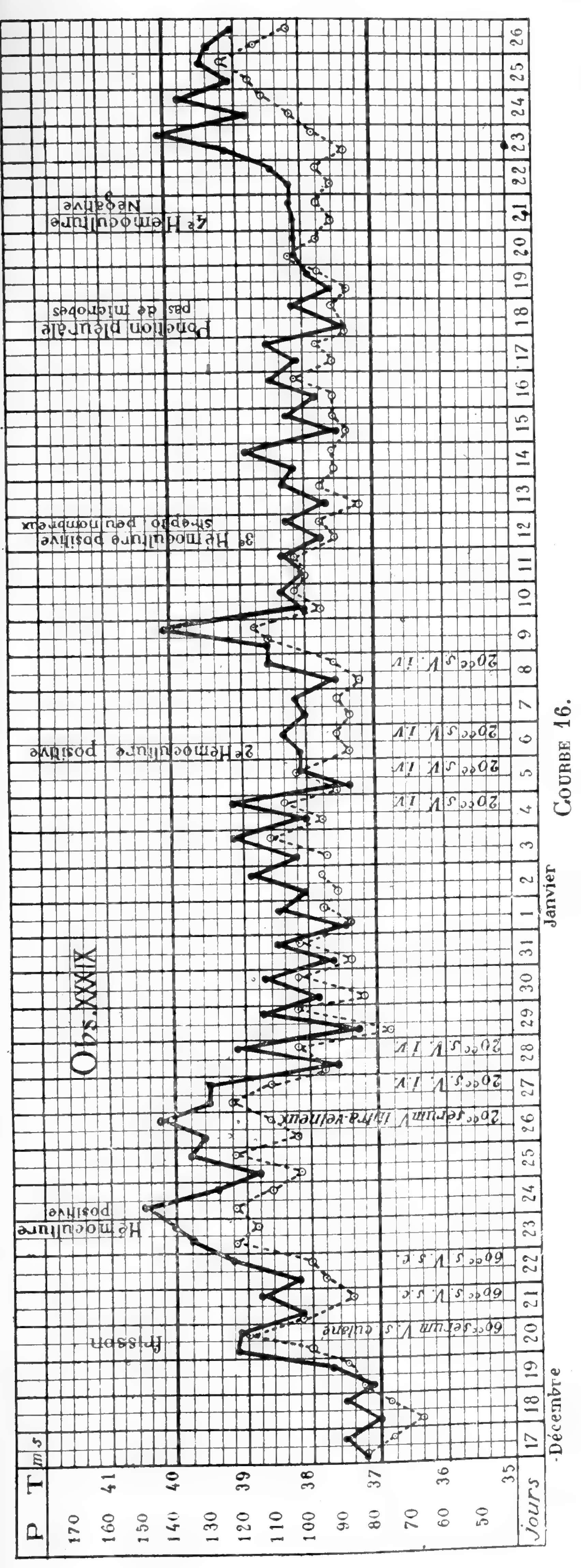
Le lendemain, chute du pouls de 120 à 80, plus de vomissements, la douleur abdominale est très diminuée, température : 38°8.

Le 23 décembre, la température remonte à 40°, le pouls à 120, incontinence des matières fécales.

Une hémoculture est pratiquée le 23 décembre, après vingt-quatre heures elle donne du *streptocoque* (hémolytique, rétracte fortement le lait après quarante-huit heures, 1/10 de cent. cube de cette culture tue une souris après cinq jours).

Le 25 décembre, nouveau vomissement, la malade souffre de la région occipitale, l'insomnie persiste de même que l'incontinence des matières fécales, conjonctivite œil droit.

Le 26 décembre, première injection intraveineuse du sérum V (20 cent.



cubes + 180 cent. cubes d'eau physiologique), température : 40°2. L'injection est suivie d'une réaction très forte : frisson trente minutes, puis sommeil.

Le 27 décembre, deuxième injection du sérum : 20 cent. cubes.

Le 28 décembre, une troisième injection intraveineuse du sérum, même dose.

Chaque injection est suivie d'un frisson prolongé, puis sommeil et bouffée de chaleur.

Le 29 décembre, la température est tombée à 38°7 (pouls 100). Conjonctivite rétrocède, plus de vomissemen ni de diarrhée.

Pendant les cinq jours suivants la température se maintient au-dessus de 38° avec un pouls variant entre 80 et 100. Pas de céphalée, sommeil.

Nous sommes le 2 janvier.

Le 3 janvier, incision d'une petite collection grosseur d'une noix de la région malléolaire externe à droite. La température remonte à 39°2.

Le 4 janvier, la température se maintient à 39°2.

On reprend l'injection intraveineuse de 20 cent. cubes du sérum et on la répète le 5 janvier, le 6 et le 8 janvier. Après les injections, une réaction toujours : frisson, sueurs profuses.

Le 6 janvier, une deuxième hémoculture pratiquée montre du streptocoque très nombreux encore (hémolytique, forte rétraction latérale après quarante-huit heures, virulence accrue, 1/10 de cent. cube tue la souris après quarante-huit heures), mais la vitalité de ce streptocoque

est très atténuée (par comparaison avec celui de la première hémoculture), la souche est morte après trois jours de séjour à la glacière.

La dernière, septième injection intraveineuse du sérum, est faite le 8 janvier.

Le 10 janvier, chute de température à 38°4 et, depuis ce moment, pendant treize jours la température ne dépassait pas 38° ; le pouls oscillait entre 80-90.

Sommeil, aucune douleur, pas de diarrhée, pas de vomissement, mais facies amaigri, la femme tousse et crache beaucoup. Elle se plaint de douleurs dans le côté gauche.

A l'auscultation, pas de signe net d'épanchement, mais signe de bronchite diffuse des deux côtés.

Le 12 janvier, une troisième hémoculture montre du *streptocoque* très peu nombreux (à peine hémolytique, la virulence atténuée : la souris ne meurt que quatre jours après avoir été inoculée avec 1/10 de culture, la morphologie de quelques chaînettes que l'on trouve dans l'hémoculture est complètement différente de la précédente; ce sont des éléments désagrégés, comme fondus).

Le 18 janvier, une ponction exploratrice pleurale donne une très petite quantité de liquide citrin (quelques gouttes).

L'examen bactériologique du liquide pleural reste stérile, quelques très rares mononucléaires.

Le 21 janvier, une *quatrième hémoculture est pratiquée,* elle reste *négative.* La température est à 38° 2.

Le 22 janvier, elle remonte à 38°5.

Le 23 janvier, elle atteint 40°1, mais baisse les jours suivants.

Le 24 janvier, elle est à 39°8.

Le 25 janvier, elle est à 39°5.

Le 26 janvier, elle est à 39° (pouls 104).

Le 27 janvier, la malade veut absolument rentrer chez elle.

Dix jours après, elle meurt chez elle (Courbe 16).

Observation XL (Baudelocque 80 de 1920). — Accouchement et délivrance en ville. Le contrôle bactériologique est fait dix jours après l'accouchement. Streptocoque dans le sang. Injections sous-cutanées du sérum, une injection intraveineuse du sérum faite le vingt-troisième jour de l'infection. Morte le lendemain de l'injection.

Lucienne N..., vingt-trois ans. Primipare. Antécédents : scarlatine à quatorze ans, congestion pulmonaire à seize ans. Accouchée et délivrée en ville le 13 juin, rentre à la clinique Baudelocque le 17 juin ayant de la fièvre.

Le 18 juin, 38 crevasses des seins et lymphangite.

Pendant les trois jours suivants, la température est au-dessous de 38° (pouls 80-88).

Le 22 juin, la température monte brusquement à 40° (pouls 110), frisson.

Violente douleur dans le ventre siégeant dans la fosse iliaque gauche, dans la nuit, céphalée, sueurs, abattement.

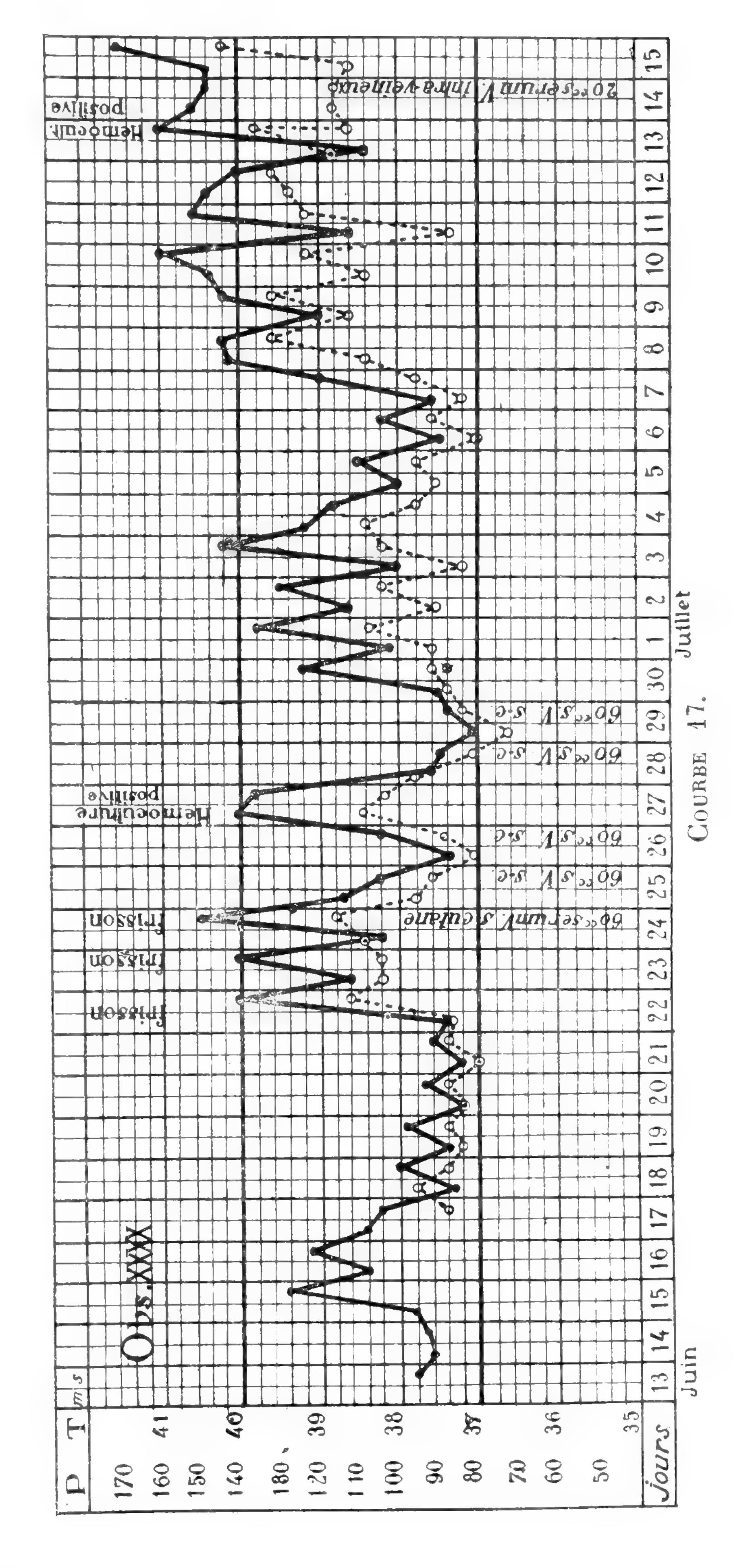
Le 23 juin (dix jours après l'accouchement), on fait l'examen bactériologique des lochies qui montrent du *streptocoque* en culture pure (légèrement hémolytique 1/10 de cent. cube de cette culture tue la souris après dix jours, rétraction latérale du lait après trois jours).

Même état, douleur dans la fosse iliaque gauche, céphalée; deuxième frisson, température : 40°.

Le 24 juin, un troisième frisson, température 40°5, la douleur persistante

dans la fosse iliaque gauche. Pas de lochies fétides, pas de vomissements.

Le 24 juin au soir (le douzième jour après l'accouchement), première injection sous-cutanée du sérum antistreptococcique V de 60 cent. cubes, suivie de deux autres de 60 cent. cubes.



Courbe 17.

Après la première injection du sérum, chute de la température, le lendemain à 38°2, pouls de 116 tombe à 90.

Le surlendemain 38°2, pouls 88, pas de frisson depuis deux jours.

Le 27 juin, brusque élévation à 40°, frisson, état nauséeux, douleur vive à la fosse iliaque gauche et se propageant vers le flanc, un peu d'œdème inguinal gauche. On pratique le 27 juin une hémoculture et le 28 juin on refait pendant deux jours deux injections sous la peau du sérum de 60 cent. cubes chaque injection.

Le 28 et le 29 juin, chute de température à 37°5 pouls 80). Les douleurs spontanées ont disparu. Etat général bon, langue humide. Apparition d'une éruption sérique.

On arrête les injections sous-cutanées du sérum. L'hémoculture faite le 27 juin donne après quarante-huit heures du streptocoque.

Le 30 juin au soir, la température remonte à 39°2.

Le 4 juillet, elle est à 40°2 de nouveau, pas de frissons, éruption sérique aux poignets et très légèrement aux genoux.

Le 5 juillet, elle tombe à 38°5, diminution des douleurs et gonflement des poignets.

Le 6 juillet, température à 38°2, douleurs spontanées nulles, douleur à la palpation de la fosse iliaque gauche maximum au niveau d'une région située

à mi-distance de l'ombilic, douleur du poignet disparue, apparition d'une douleur à l'épaule gauche, l'éruption a considérablement pâli.

Le 8 juillet, élévation brusque de température à 40° 2 (pouls 130) qui reste pendant les jours suivants au-dessus de 40°.

Le membre inférieur gauche est très douloureux.

Compresses de chlorhydrate d'ammoniaque.

Léger œdème du membre inférieur droit.

Le 13 juillet, on refait une hémoculture, elle donne après vingt heures du streptocoque très nombreux (moyennement hémolytique, virulent pour la souris, 1/10 de la culture tue la souris après trois jours, sans action sur le lait); la température est à 41° (pouls 140).

Le 14 juillet (dix-sept jours depuis la première hémoculture et le vingt-troisième jour depuis le début de l'infection), on fait une injection intraveineuse du sérum (20 cent. cubes du sérum dans 180 cent. cubes d'eau physiologique).

Le 15 juillet, pouls rapide, mais bien frappé, régulier, légère amélioration du facies, langue moins sèche.

Etat de cyanose dans la soirée.

Bouffissure de la face.

Morte à 8 h. 15 du soir (Courbe 17).

Observation XLI (Baudelocque 735 de 1920). — Septicémie puerpérale Injection sous-cutanée du sérum. Mort.

Léontine G..., vingt-six ans. II-pare.

Première gestation normale.

Deuxième gestation, hydramnios.

Rupture prématurée des membranes. Accouchement gémellaire le 29 avril, les deux enfants morts après quelques inspirations.

Délivrance artificielle pour défaut de décollement deux heures après l'accouchement.

Le 29 avril, examen bactériologique des lochies montre un *streptocoque* (non hémolytique, ne rétracte pas le lait).

Le 30 avril au soir, la température monte brusquement à 40° 8 (pouls 160), frisson, éruption sur l'abdomen et les cuisses, céphalée

Depuis le 30 avril, la température reste au-dessus de 40°, pouls très élevé au-dessus de 140.

Le 1er mai, abcès de fixation qui ne prend pas.

Injection sous la peau du sérum V de 60 cent. cubes, suivie des six autres injections (en tout 420 cent. cubes).

Le 3 mai, abattement très marqué le soir, température 40°7, pouls 130.

Le 10 mai, dyspnée assez intense, ventre non douloureux, lochies fétides.

Le 11 mai, éruption sérique généralisée et douleur polyarticulaire.

Le 13 mai, la femme tousse et crache abondamment, râles crépitants et sous-crépitants à droite, la température à 40°5, pouls 140.

Le 14 mai, dyspnée intense, facies très amaigri, nez pincé, yeux excaves, ballonnement du ventre.

Morte le 15 mai (Courbe 18).

Observation XLII (de la ville, communiquée par M. le Dr Robert Dupont). Septicémie puerpérale. Streptocoque dans le sang. Injection intraveineuse du sérum antistreptococcique Vinaver. Guérison.

Mme V..., vingt-trois ans, primipare, dernières règles le 30 juin 1920. Perte

des eaux le 30 mars au matin. Le 1er avril 1921, température : 38°5, dans la soirée de ce jour accouchement facile d'une fille bien constituée.

Délivrance naturelle paraissant complète. La température oscille autour de 38° pendant trois jours.

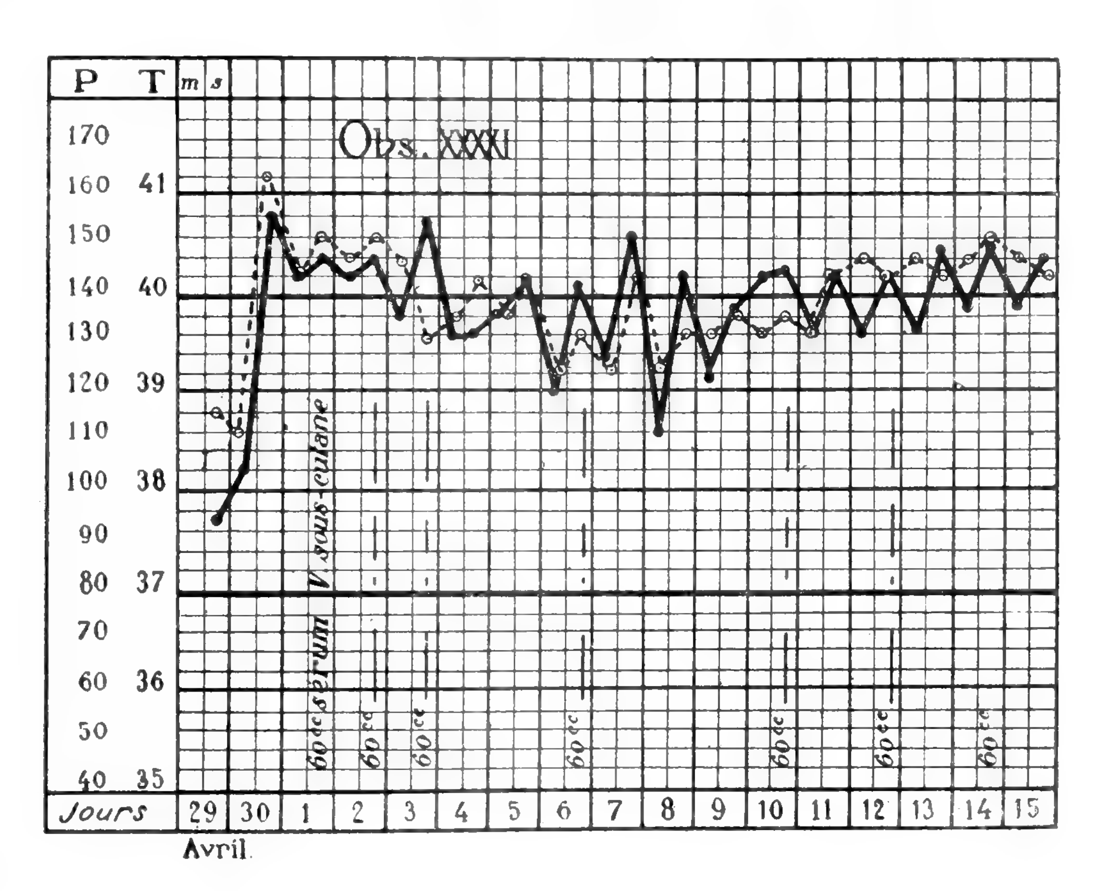
Le 4 avril, elle est à 37°, mais le pouls reste rapide, autour de 110.

Les urines sont rares, 500 grammes en moyenne par vingt-quatre heures.

Malgré ces symptômes il n'y a rien d'alarmant du côté de l'utérus.

Le 10 avril, élévation de température à 38° 9, mais le lendemain la température est de nouveau normale.

Dans la nuit du 12 au 13 forte hémorragie qui nécessite un curettage



COURBE 18.

suivi d'un tamponnement, la température le 13 au soir est à 40° 9, un frisson.

Le 14 avril, la température monte à 41° (pouls 154), nouveau frisson.

Depuis, les frissons persistent les 17, 18, 19, avec la température oscillant entre 38° et 40°3, montant à 41°2 le 19 avril au moment du frisson.

Le 19 et le 20 avril, injection intra-veineuse de sulfate de cuivre ammoniacal.

Le 20 avril, la température est à 40°2. Le 21 avril, elle s'élève à 40° 5, pouls 150, un frisson.

Les urines continuent toujours à être très rares, la malade est pâle, fatiguée et abattue. Le facies œdématié, sub-ictérique, insomnies.

Les lochies peu abondantes.

C'est à ce moment que le Dr Robert Dupont voit la malade.

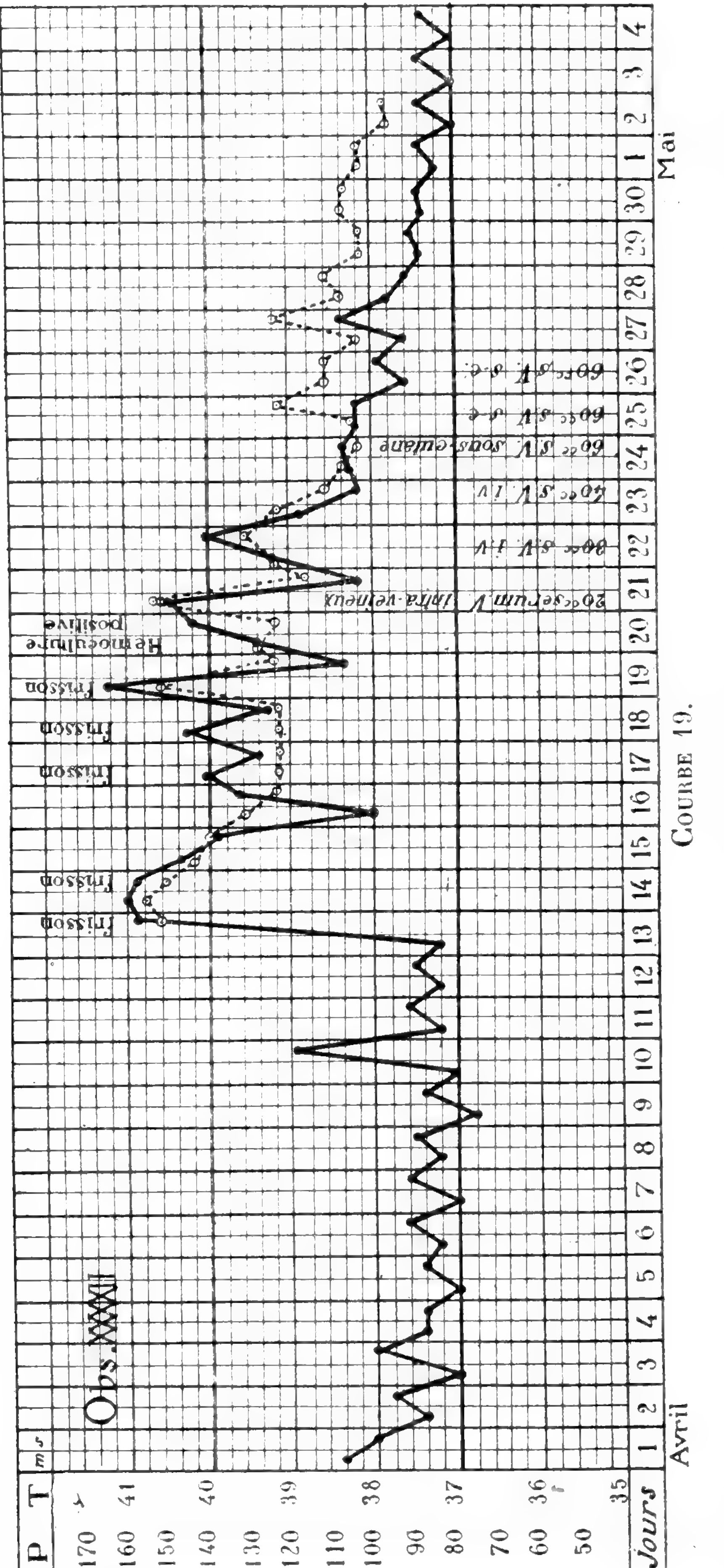
Le 20 avril, on pratique la prise de sang ; hémoculture donne nombreux *streptocoques* (hémolytiques non virulents pour la souris).

Injection sous-cutanée de térébenthine, il y a eu un peu de rougeur et formation d'une petite phlyctène suppurée, *pas d'abcès franc.*

Le 21 avril, première injection intraveineuse du sérum antistreptococcique V (20 cent. cubes du sérum dans 180 cent. cubes d'eau physiologique), la température était à 40°5.

Le 22 avril la température est à 40° (pouls 230).

On pratique une deuxième injection intraveineuse du sérum V (30 c. c. de sérum dans 270 c. c. d'eau physiologique).



Courbe 19.

Un quart d'heure après cette injection, la malade a des sueurs très abondantes, elle s'endort ensuite et passe une bonne nuit.

Le lendemain, le 23 avril, la température est à 38°9 le matin, 38°2 le soir; une troisième injection du sérum V est faite : 40 c. c. de sérum dans 360 c. c. d'eau physiologique.

Des sueurs très abondantes suivent encore l'injection et quarante-huit heures après la température est à 37°9 avec un pouls oscillant entre 100 et 102.

Apparition d'une diurèse très marquée ; les urines, qui n'étaient que de 500 grammes, montent à 1.000 grammes. L'œdème disparaît, le facies se recolore, l'état général de la malade est nettement transformé, elle dort et demande à manger.

Pendant trois jours on fait encore, tout le jour, sous la peau 60 cent. cubes du sérum V. La quantité des urines continue à augmenter progressivement (plus de 1.500 grammes le 1er mai), en même temps que la température descend en lysis.

Elle est à 37° le 2 mai (pouls 90). Pas d'accidents sériques.

L'état excellent, la malade sort le 10 mai complètement guérie (Courbe 19).

Observation XLIII (due à l'obligeance de M. le Dr Marc Rivière, de Bordeaux). Septicémie puerpérale, streptocoque dans le sang. Injections intraveineuse et sous-cutanée (à doses massives) du sérum antistreptococcique Vinaver. Guérison.

Mme D..., vingt-deux ans. Primipare. Grossesse normale marquée seulement par quelques troubles digestifs. Début du travail dans la nuit du 15 au 16 novembre. Rupture prématurée des membranes, dilatation lente. Utérus inerte depuis plus de deux heures, application de forceps.

Extraction assez pénible d'un enfant de 4 kilogr. 100, vivant; légère déchirure du périnée réparée aussitôt.

Suites de couches d'abord tout à fait normales; pendant la première semaine, la température n'atteint pas 37°, le huitième jour brusquement la température s'élève à 39°. Purgatif, la température revient le lendemain à la normale.

Le 3 décembre, un frisson violent, angine et érythème scarlatiniforme, température 39°5 (pouls 120). Rien du côté utérin, mais le périnée qui n'avait présenté ni gonflement ni suintement est désuni.

L'hémoculture faite a donné du streptocoque pur, la température est à 40°5.

Le 14 décembre, une première injection sous-cutanée de 60 cent. cubes du sérum Vivaner (la température était à 39°6) répétée pendant trois jours de suite. Déjà après la deuxième injection du sérum, la malade se sent beaucoup mieux, la température descend à 36°9, le pouls de 120 passe à 80. Mais le 18 décembre, nouvelle ascension thermique à 40°2 (pouls 124). La malade accuse des douleurs vives au niveau de toutes ses articulations, un peu d'érythème au niveau des avant-bras (réaction sérique). Une petite syncope dans l'après-midi qui ne s'est pas reproduite. Pas de frissons depuis l'injection sous-cutanée du sérum.

On craint des accidents anaphylactiques vu la réaction sérique et on ne continue pas le sérum.

Les 18, 19, 20, 21, 22, 23 décembre, on fait l'électragol intraveineux.

La température continue à faire de grandes oscillations; le matin 36, 37°2, le soir 40°2. Pas d'amélioration.

Le 25, la température est à 40°4. On pratique alors l'*injection intra-veineuse* du sérum Vivaner (20 cent. cubes de sérum dans 180 cent. cubes d'eau physiologique).

L'injection est suivie d'une réaction violente, claquement des dents, excitation cérébrale et motrice, délire, etc...

Le lendemain, chute de température à 36°4, le pouls de 138 est tombé à 90.

Un abcès de fixation fait à ce moment, le cinquième que l'on essaie de faire depuis le début de la maladie, prend enfin.

On n'ose pas renouveler l'injection intraveineuse et quarante-huit heures après la température remonte de nouveau, le pouls s'élève et les frissons réapparaissent. Depuis le 30 décembre jusqu'au 27 janvier la température subit de grandes oscillations entre 36°4 et 41°, chaque nouvelle ascension étant précédée d'un grand frisson.

L'hémoculture, faite pour la quatrième fois le 5 janvier, montre du streptocoque pur en chaînettes immenses de longueur. On est au cinquante-deuxième jour après l'accouchement et quarante-deuxième jour de la maladie.

On reprend les injections sous-cutanées du sérum Vinaver, la malade reçoit en tout 500 cent. cubes du sérum par la voie sous-cutanée (médication toni-cardiaque en plus).

Une amélioration se fait progressivement à partir du 26 janvier, le 11 février la température n'atteint que 37°4 et se maintient normale depuis, avec quelquefois encore petites variations passagères (38°6, 38°8). Elle se stabilise définitivement le 1er avril, et la guérison est complète.

BIBLIOGRAPHIE

MAYERHOFER. *Monatsschr. f. Geburtsh*, p. 123, 1869.

ROKITANSKI. *Strickers Jahrbücher* 1874. — *Handbuch d. pathol. Anat., Wien*, 1846.

HAUSSMANN. *Centralblatt*, 1874.

COZE ET FELTZ, Recherche expérimentale sur la présence des infusoires et l'état du sang dans les maladies infectieuses. *Gaz. Méd. de Strasbourg*, 1869.

E. QUINQUAUD, Essai sur le puerpérisme infectieux chez la femme et chez les nouveau-nés. *Thèse* 1872.

PASTEUR, Septicémie puerpérale. *Bull. Acad. de Méd.*, 1879, p. 271.

DOLERIS, La fièvre puerpérale et les organismes inférieurs. Pathogénie et thérapeutique des accid. infect. des suites de couches. *Thèse* de Paris, 1880. — Les lochies et les organismes inférieurs, *Ann. de Gynécol.*, février 1884. — Etiologie et nature des infections puerpérales. Rapport 13e Congrès Intern. des Sciences Méd., août 1900. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1900, p. 3.

CHAUVEAU, Septicémie puerpérale expérimentale. *Lyon médical*, 1882.

WIDAL, Etude sur l'inf. puerpérale, la phlegmatia alba dolens et l'érysipèle. *Thèse* Paris, 1889.

MENGE ET KRONIG, U. verschied. Streptokokkenarten, *Monatsschr. f. Geburtsh. und Gynäk.*, juin 1899.

ARLOING, Contribution à l'étude de l'agent virulent de la septic. puerp. *Acad. des Sc.*, 1884.

WILLIAMS. *Amer. Journ. of Obstetrics*, 1898.

NATVIG, Bakt. Verhalten. in weibl. Genitalsekr. Studien u. Streptokokken d. weibl. Genitalien in Partus u. Puerperium. *Arch. f. Gyn.* 1905, **76**, 3.

GÖNNER, U. Microorganis. im Sekret. d. weibl. Genitalien während d. Schwängersch. bei puerp. Erkrank. *Centr. Bl. f. Gynäkol.*, 2 juillet 1887.

FABRE. *Précis d'Obstétrique*, 1910, p. 645.

— Traitement prophylactique et curatif des infections puerpérales à streptocoque pyogène par l'essence de térébenthine. *Obstétrique*, janvier 1908.

FABRE et BOURRET, Une épidémie de fièvre puerpérale ayant comme point de départ un porteur sain de streptocoque. *Bull. d'Obstétr. et de Gynéc.*, 1910.

WALTHARD, Bakter. Untersuch. d. weibl. Genitalsekretes in Gravid. u. in Puerperium. *Arch. f. Gynaek.* 1895, **48**, 2.

VAHLE, Ueber d. Vorkommen von Streptokokken in der Scheide gebärender. *Zeit. f. Geb. u. Gynaek.*, 1896, **35**, p. 2.

STEFFECK, Fondement bactériologique de l'auto-infection. *Zeit. f. Geb. u. Gynaek.*, **20**, 389.

KALTENBACH, Sur la question de l'auto-infection, IIIe Congrès tenu à Fribourg par la Société de Gynécologie allemande. *Ann. de Gynéc. et d'Obst.*, 1889.

R. DE BOVIS, L'auto-infection puerpérale au point de vue bactériologique. *Semaine médicale*, 19 septembre 1906.

RUSTRA, Puerperal infection. *Philippine Journ. of Science*, 1920, **17**, p. 119.

PERMAN, Une analyse de la flore vaginale à la fin de la grossesse. *The Amer. Journ. of. Obstetrics*, août 1917.

SCHWEITZER, De la prophylaxie de la fièvre puerpérale. Leipzig, 1913 (analyse *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1914-1915, p. 53.

JEANNIN, Infections puerpérales putrides (recherches cliniques et bactériologiques). *Thèse*, 1902.

DOEDERLEIN, Die Erfolge des bakteriol. Forschung in Erkennung, Verhü-

tung. u. Behandlung der Kindbettfibers. *Deuts. med. Woch.*, 1904, **30**, p. 1793.

BURKHARDT, Saprémie ou bactériémie, *Arch. f. Gynaek.*, **95**, p. 552.

SCHIAVONI. *Clinica Obstetrica*, 1900, n° 9.

E. SACHS, Recherches bactériologiques de la fièvre sub partum. *Zeit. f. Geb. u. Gynaek.*, **70**, p. 222.

GONNET, Streptocoque pyogène et infection puerpérale. L'*Obstétrique*, 1907, page 38.

E. BUMM et W. SIGWART, Untersuch. über die Beziehungen d. Streptococcus zum puerperal fieber. *Beitr. z. Geburts. u. Gynaek.*, 1904, **8**, p. 3.

SIGWART. *Arch. f. Gynaek.*, 1909, **87**, p. 469.

METZGER, Le streptocoque hémolytique dans l'infection puerpérale. *La Presse Médicale*, 15 avril 1911.

WINTER, Die Micro-organismen in Genitalcanal der gesund. Frauen. *Zeits. f. Geburtsh. u. Gynaek.*, 1887, **14**.

— Ueber d. Bacteriengehalt d. Cervix. *Centralbl. f. Gynaek.*, 11 mai 1895.

LABUSQUIÈRE, Fièvre puerpérale et sa prophylaxie. *Ann. de Gyn. et d'Obst.* (*Revue générale*), 1909.

— Toxémie ou bactériémie, thérapie active ou expectation. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1912, p. 357.

ZANGEMEISTER, La recherche bactériologique auxiliaire pour le diagnostic et le pronostic de l'infection puerpérale. Berlin, 1910 (analyse dans les *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1911, p. 317).

WARNEKROS, Ueber drei bemerkenswerte Fälle von puerperal Pyämie. *Arch. f. Gynaek.*, 1912, p. 27.

POTOCKI, Bactériologie sanguine dans l'infection puerpérale. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1918-1919.

BASSET, La septicémie puerpérale atténuée, forme clinique, bactériologique, trait., *Thèse*, 1893.

A. PINARD et WALLICH. *Traitement de l'infection puerpérale*, 1896.

A. PINARD, Des interventions intra-utérines pendant les suites de couches. *Revue prat. d'Obst. et de Pédiatrie*, juin 1905, p. 161.

— Traitement des infections puerpérales. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1909, p. 577.

PINARD et VARNIER, De l'irrigation continue comme traitement prophylactique et curatif de l'infection puerpérale. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1886.

VARNIER, Streptococcie puerpérale, *Obstétrique Journalière*, 1900, p. 344.

WALLICH, De la sérothérapie appliquée à la septicémie puerpérale. Rapport du XII[e] Congrès des sciences médicales de Moscou, 1897, *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1897.

TARNIER, De l'asepsie et de l'antisepsie en obstétrique. Paris, 1894.

LARAN, Traitement de l'infection puerpérale. *Thèse*, 1896.

H. VIGNES, Notions générales sur l'infection puerpérale. *Journ. des Praticiens*, n° 47, novembre 1920, p. 745.

— La thérapeutique intra-utérine de l'infection utérine *post partum*, *Gyn. et Obst.*, 4, 1920, n° 3.

A. TURENNE, Traitement de l'infection puerpérale. Rapport au III[e] Congrès méd. lat. amér. à Montevido. *Ann. de Gyn. et d'Obst.*, 1907.

CHARRIN et ROGER, Essai d'application de la sérumthérapie au traitement de la fièvre puerpérale. *C. R. Soc. de Biol.*, 23 février 1895.

MARMOREK, Le streptocoque et le sérum antistreptococcique. Ces *Annales*, juillet 1895, p. 593.

BESREDKA, Le sérum antistreptococcique et son mode d'action. Ces *Annales*, 1904, p. 363.

VINGT ANNÉES DE FONCTIONNEMENT DU SERVICE DE LA RAGE A L'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DE LYON ET DU SUD-EST

par

Paul COURMONT et A. ROCHAIX

Directeur de l'Institut bactériologique.

Sous-directeur, chef du Service de la rage à l'Institut bactériologique

L'Institut bactériologique de Lyon et du Sud-Est, fondé en 1900 par S. Arloing et Jules Courmont, dirigé actuellement par le professeur Paul Courmont, a terminé en 1919 sa vingtième année d'existence. Le premier service organisé, en 1900, très modestement alors, dans des locaux de la Faculté de Médecine jusqu'à son transfert, en 1906, dans les bâtiments actuels de l'Institut, a été le service de la rage. Comme le font la plupart des Instituts, nous publions aujourd'hui le fonctionnement de ce service pendant les vingt premières années de son existence (1900-1919) (1).

*
* *

Les personnes mordues ou contaminées d'autres façons (lèchements sur plaies, etc.), qui viennent se soumettre au traitement à l'Institut bactériologique de Lyon et du Sud-Est, proviennent surtout des départements constituant la région lyonnaise : Rhône, Ain, Jura, Loire, Haute-Loire, Saône-et-Loire, Isère, Drôme, Ardèche, Savoie, Haute-Savoie, etc., soit environ 15 départements. Pendant la guerre 1914-1918, par suite du mouvement considérable qui se produisait alors

(1) Les chefs de service ont été au cours de cette période : de 1900 à 1907, MM. J. Nicolas et Ch. Lesieur ; en 1908-1909, MM. Lesieur et L. Thévenot ; en 1910-1911, MM. L. Thévenot et J. Chattot ; depuis 1912, M. A. Rochaix.

dans nos populations, il en est venu de départements plus éloignés.

De 1900 à 1919, le service antirabique de l'Institut a traité 12.886 personnes contre la rage : 6.950 pendant la première décade (1900-1909); 5.936 pendant la seconde (1910-1919).

Les formules de vaccination antirabique étaient primitivement celles qu'avait établies Pasteur. Mais elles ont été modifiées à plusieurs reprises au fur et à mesure que l'on connaissait mieux le vaccin pastorien. Actuellement, la vaccination se fait en quinze, dix-huit, vingt-un et vingt-cinq jours, suivant le siège et la gravité de la morsure. Les formules utilisées maintenant à l'Institut de Lyon sont les suivantes :

Jours de traitement	Doses	Age des moelles
—	—	—
1	3 cent. cubes	7 jours.
2	3 —	6 —
3	3 —	6 —
4	3 —	5 —
5	3 —	5 —
6	3 —	4 —
7	3 —	4 —
8	3 —	3 —
9	3 —	5 —
10	3 —	4 —
11	3 —	3 —
12	3 —	4 —
13	3 —	4 —
14	3 —	3 —
15	3 —	2 —
16	3 —	4 —
17	3 —	3 —
18	3 —	2 —
19	3 —	3 —
20	3 —	2 —
21	3 —	2 —
22	3 —	3 —
23	3 —	3 —
24	3 —	2 —
25	3 —	2 —

Traitement minimum de 15 jours. (jours 1 à 15)
Traitement de 18 jours. (jours 1 à 18)
Traitement de 21 jours. (jours 1 à 21)
Traitement de 25 jours. (jours 1 à 25)

* * *

Voici, année par année, le nombre des traitements effectués et la mortalité correspondante.

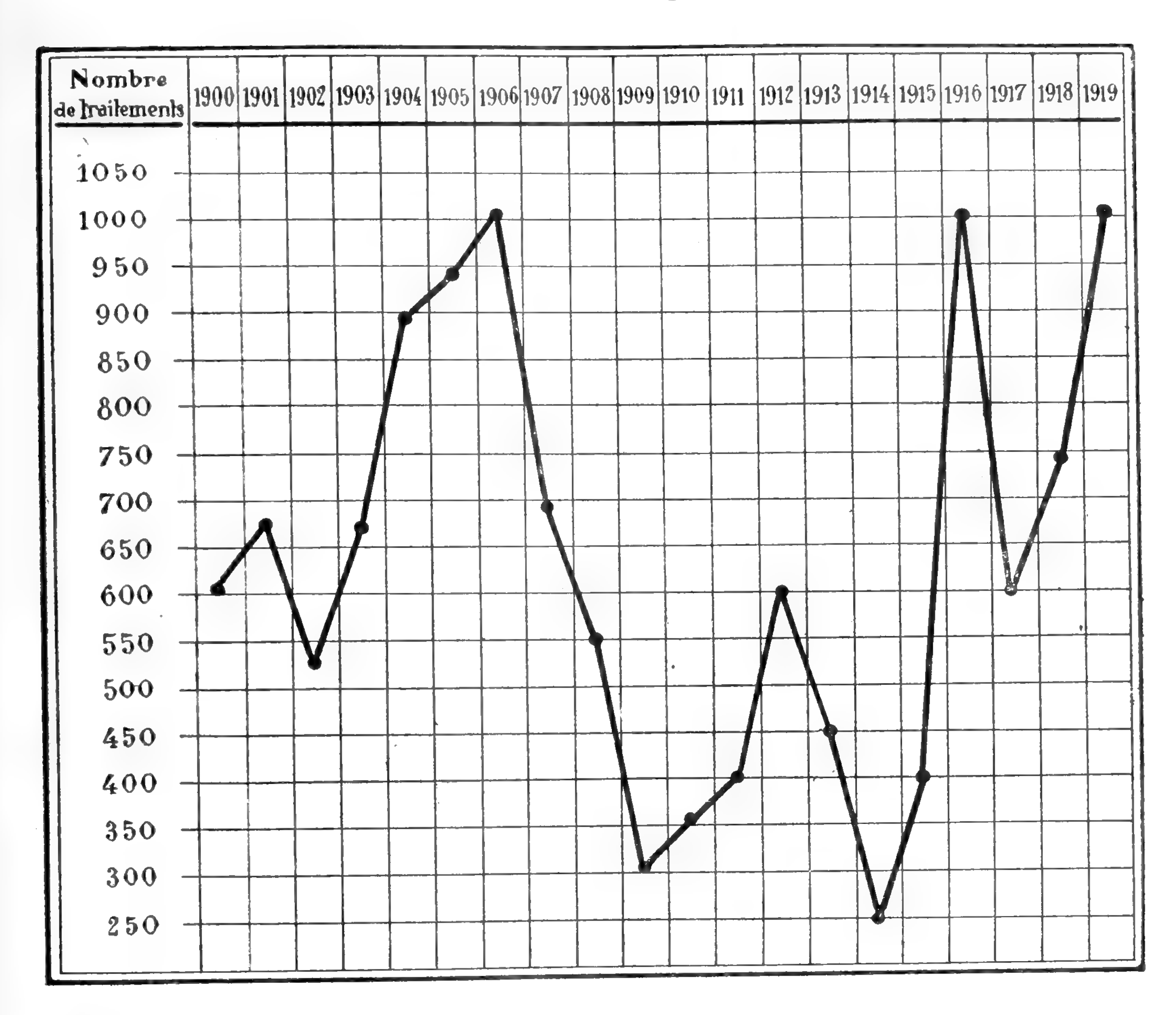
Années	Personnes traitées	Morts	Mortalité p. 100
1900	614	2	0,325
1901	689	1	0,145
1902	537	1	0,186
1903	673	0	0
1904	893	0	0
1905	946	1	0,105
1906	1.023	1	0,097
1907	692	0	0
1908	552	0	0
1909	331	0	0
1910	366	0	0
1911	409	0	0
1912	605	2	0,330
1913	459	0	0
1914	264	0	0
1915	433	0	0
1916	1.008	1	0,099
1917	602	1	0,166
1918	783	0	0
1919	1.007	1	0,098
Totaux.	12.886	11	0,085

La courbe ci-contre permettra de mieux se rendre compte des variations du nombre des traitements au cours de la période qui nous occupe, et par là même des variations de la densité de la rage animale dans la région lyonnaise.

Comme on le voit, il y a eu dans notre région une recrudescence de rage très nette vers 1904-1906, puis pendant la guerre à partir de 1916. Cette dernière recrudescence s'est fait sentir dans toute la France et plus particulièrement peut-être encore dans la région parisienne. Les chiens abandonnés, surtout dans les régions envahies, la mobilisation des vétérinaires dans les campagnes, le laisser-aller inévitable qui s'est produit dans l'application des règlements municipaux concernant le port de la muselière et l'obligation de mener les chiens en laisse, constituent un ensemble de faits qui expliquent aisément le ressaut de la courbe en 1916. Trois années après, en 1919, une nouvelle recrudescence se manifeste : celle-ci est la conséquence de la précédente, aggravée du fait qu'au moment du retour des soldats du corps expéditionnaire d'Orient, beaucoup d'entre eux ont ramené à leur foyer des chiens, qui dans les mois qui ont suivi ont présenté une rage

déclarée, ont mordu leurs congénères et fait des victimes dans l'entourage de leurs maîtres.

Il est à espérer que les mesures que la plupart des munici-



palités ont commencé à prendre, devant la recrudescence du fléau, porteront bientôt leurs fruits.

*
* *

Au point de vue de leur provenance, voici la répartition, *par département*, des 12.886 personnes traitées :

Lyon	3.588	Haute-Loire	329
Rhône (hors Lyon)	1.901	Haute-Saône	24
Ain	684	Haute-Savoie	137
Allier	68	Isère	1.655
Ardèche	641	Jura	176
Côte-d'Or	29	Loire	1.454
Doubs	82	Puy-de-Dôme	67
Drôme	1.109	Saône-et-Loire	566
Hautes-Alpes	81	Savoie	374
Basses-Alpes	4	Vaucluse	24

Ces départements sont tributaires, géographiquement, de l'Institut et constituent la clientèle habituelle et normale du service antirabique. Mais il est venu exceptionnellement quelques personnes de régions plus éloignées ;

Algérie	1	Lozère	2
Alsace	4	Maine-et-Loire	1
Aude	1	Marne	3
Ardennes	1	Meuse	6
Alpes-Maritimes	1	Meurthe-et-Moselle	1
Bouches-du-Rhône	5	Nièvre	4
Creuse	3	Oise	1
Corrèze	4	Seine-et-Oise	1
Cher	1	Suisse (canton de Genève)	7
Gard	14	Tarn-et-Garonne	1
Haute-Marne	4	Var	5
Hérault	3	Vosges	4
Lorraine	1	Yonne	1
Loire-Inférieure	1		

* * *

Suivant les mois de l'année, les traitements commencés se répartissent de la façon suivante :

Janvier	968	Juillet	1.190
Février	926	Août	1.147
Mars	1.064	Septembre	1.056
Avril	1.172	Octobre	1.050
Mai	1.159	Novembre	955
Juin	1.103	Décembre	980

La moyenne des traités a été de 35 par jour environ, avec un maximun moyen de plus de 38 au mois de juillet et un minimum de 33 au mois de février.

* * *

Les personnes traitées à l'Institut bactériologique de Lyon sont divisées en deux catégories, correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée soit par un examen vétérinaire clinique ou nécropsique, soit expérimentalement par le développement de la maladie chez les animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — L'animal mordeur est seulement suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1900-1919.

	TÊTE			MEMBRES supérieurs			TRONC et MEMBRES inférieurs			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité
Tableau A	1.372	3	0,218	5.774	5	0,086	1.143	1	0,087	8.289	9	0,108
— B	388	0	0	2.785	2	0,071	1.424	0	0	4.597	2	0,043
Totaux.	1.760	3	0,172	8.559	7	0,081	2.567	1	0,038	12.886	11	0,085

Les résultats de cette statistique sont conformes aux données classiques : plus grande gravité des morsures à la tête (en raison de la plus courte durée de l'incubation). Un point que la statistique globale ci-dessus ne met pas en évidence, mais qui ressort de son étude détaillée, année par année (que nous ne pouvions publier en raison de sa longueur), est l'augmentation depuis 1916 du nombre des morsures par chiens dont la rage a été dûment *constatée* soit par l'examen vétérinaire, soit à la suite de l'inoculation du bulbe (tableau A). Alors que dans les années qui ont précédé la guerre les morsures par chiens simplement suspects (tableau B) étaient égales en nombre ou même plus nombreuses que les morsures par chiens sûrement enragés, à partir de 1916 la catégorie du tableau A augmente considérablement. Cette constatation est l'indication de la recrudescence certaine de la rage animale dans la région lyonnaise, concordant d'ailleurs avec une constatation identique dans d'autres régions, en particulier à Paris et dans le département de la Seine. M. Roux, directeur de l'Institut Pasteur, a d'ailleurs attiré l'attention sur ces faits ces derniers temps, soit à la tribune de l'Académie de Médecine, soit au Conseil d'Hygiène et de Salubrité du département de la Seine.

*
* *

Au point de vue du *sexe*, ont été traités :

Hommes	7.353
Femmes	5.533

*
* *

Au point de vue de l'*âge*, les personnes traitées se répartissent ainsi :

De 0 à 5 ans	1.114
5 à 10 —	1.475
10 à 15 —	1.533
15 à 20 —	1.115
20 ans et au-dessus	7.649
Total	12.886

*
* *

Les *animaux mordeurs* ont été les suivants :

Chiens	11.423
Chats	1.022
Bovidés	317
Chevaux et ânes	21
Divers (chèvres, brebis, singes, poules, porcs, lapins, renards, écureuils, etc.)	64
Hommes	60

Une particularité à signaler a été l'accroissement rapide du nombre des *bovidés* atteints de rage, pendant la période qui a coïncidé avec la guerre. Alors que jusqu'à 1914-1915 le nombre des bovidés mordeurs ne se chiffrait que par quelques unités chaque année, à partir de 1916 la progression est rapide : 26 en 1916; 31 en 1917; 35 en 1918; 75 en 1919. Si l'on songe que, outre ces animaux dûment enragés, beaucoup de bovidés mordus ou suspects d'avoir été mordus, sont abattus dans les huit jours qui suivent la morsure, on peut deviner quels désastres il a dû se produire dans certains cheptels de notre région.

*
* *

Au point de vue du *genre de contamination*, on trouve :

Morsures :	8.468	uniques	5.334
		multiples	3.134
Lèchements :	4.418		

*
* *

La *mortalité* chez les individus traités à l'Institut bactériologique de Lyon est une des plus faibles que l'on connaisse. Dans la plupart des Instituts, la mortalité oscille entre 0,73 à 0,77 p. 100. A l'Institut de Lyon, la mortalité, comme on l'a vu plus haut, a été, pour 12.886 personnes traitées pendant cette période, de 0,085 p. 100.

Dans la statistique de mortalité, on ne fait pas figurer les personnes mortes de rage en cours de traitement ou moins de quinze jours après la fin de celui-ci, car on sait scientifiquement que les centres nerveux des personnes atteintes de rage dans les quinze jours qui suivent la fin du traitement ont été envahis avant que la cure ait pu avoir son efficacité.

Les onze personnes qui chargent la statistique ont, pour une part, présenté des morsures multiples et très peu profondes à la face, en particulier aux paupières et aux lèvres (cas des années 1900, 1902, 1905). Dans un cas, l'autopsie a révélé des lésions rénales (cas d'une petite fille, morte en 1916, dans le service du professeur Weill, à la Charité, qui avait un petit rein gauche atteint de sclérose avec aplasie artérielle). Dans d'autres cas, il s'agissait d'éthyliques avérés (un des deux cas de 1912, cas de 1919). Enfin, la cause probable de l'échec du traitement a échappé dans quatre cas (en 1900, 1901, 1912, 1917).

*
* *

Les *accidents* véritables, imputables au traitement, en dehors des réactions locales au point d'inoculation et de l'urticaire, toujours bénins et relativement rares (ces accidents ne sont pas comparables comme intensité et fréquence à ceux que l'on observe à la suite de l'injection de certains vaccins et sérums),

se résument dans les paralysies ascendantes, qui évoluent ordinairement sous l'aspect du type Landry.

Ces paralysies sont une rareté. On n'en compte, dans le monde entier, depuis l'application de la méthode pastorienne, qu'une centaine de cas. A l'Institut de Lyon, pour 12.886 personnes traitées, trois cas ont été observés : en 1916 (J. Courmont et Lesieur); en 1916 (A. Rochaix et P. Durand); en 1917 (A. Rochaix). On sait que la question de la pathogénie de ces paralysies n'est pas encore tranchée. Pour certains (Laveran, Chantemesse et Brouardel; Roux, Chaillou, Zaccaria, Brault, Calabrèse, Rondot, J. Koch), il s'agissait de rage atténuée par la vaccination pastorienne. Pour d'autres (Babes, Gonzalès, Bareggi, Sabarthez, Puscarin, Orlowski, etc.), ces accidents seraient dus aux toxines rabiques renfermées dans les moelles. Enfin, une dernière théorie qui semble le mieux répondre aux faits cliniques, anatomo-pathologiques et expérimentaux, attribue ces paralysies à l'action neurotoxique de la substance nerveuse étrangère injectée, exerçant une action défavorable sur la nutrition des neurones bulbaires et spinaux (Marinesco, Rochaix et Durand, Remlinger).

Publications du Service de la Rage de l'Institut Bactériologique de Lyon et du Sud-Est depuis sa fondation (1er janvier 1900).

1. J. Courmont et Ch. Lesieur, La polynucléose de la rage clinique ou expérimentale, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 16 février 1901; *Province médicale*, 9 mars 1901.

2. J. Courmont et Ch. Lesieur, La polynucléose de la rage. *Congrès de médecine de Berlin*, avril 1901; *Bull. de la Soc. vétérinaire de Lyon*, juillet 1901; *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1901, p. 599; *Province médicale*, 14 septembre 1901.

3. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1900 et 1901; *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1902, p. 716.

4. Ch. Lesieur, A propos de trois cas de rage. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 27 juin 1902; *Lyon médical*, 6 juillet 1902.

5. Ch. Lesieur et J. Paviot, Etude anatomique et clinique de trois cas de rage. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 27 juin 1902, p. 677.

6. Ch. Lesieur et J. Paviot, Etudes cliniques et anatomiques sur trois cas de rage humaine. Formes cérébelleuses, sympathiques, lésions à polynucléaires. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1902, p. 677.

7. J. Courmont et Ch. Lesieur, Remarques sur la polynucléose de la rage humaine. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 21 juin 1903; *Lyon médical*, 3 juillet 1903.

8. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise, 1900, 1901, 1902; *Lyon médical*, 13 septembre 1903.

9. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1902. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1903, p. 705.

10. S. Arloing et Ch. Lesieur, Essais de sérothérapie antirabique. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp.*, 3 novembre 1903; *Lyon médical*, 15 novembre 1903.

11. J. Courmont et J. Nicolas, Etude de la virulence de l'humeur aqueuse des lapins morts de la rage. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 12 décembre 1903; *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 15 janvier 1904.

12. Ch. Lesieur. Cytologie et virulence du liquide céphalo rachidien chez les rabiques. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 25 novembre 1904.

13. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1903. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1904, p. 910; *Lyon médical*, 13 novembre 1904.

14. Ch. Lesieur, Le liquide céphalo-rachidien dans la rage clinique et expérimentale; cytologie, virulence. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 6 décembre 1904; *Lyon médical*, 18 décembre 1904.

15. Nicolas et Favre. Erythème polymorphe purpurique consécutif à la vaccination antirabique. *Société médicale des Hôpitaux de Lyon*, 17 janvier 1906.

16. J. Nicolas et J. Paviot, Sur un cas d'hydrophobie consécutif à de simples lèchements non suivis de traitement. *Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 27 juin 1905.

17. J. Courmont et J. Nicolas, Nouveau cas de rage après morsure par un chien errant, non suivie de traitement antirabique. *Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 27 juin 1905.

18. J. Nicolas et S. Bonnamour, Karyokinèse dans la surrénale du lapin rabique, *Lyon médical*, 19 novembre 1905.

19. J. Nicolas et L. Bancel, Leucocytose au cours de la vaccination antirabique chez l'homme et chez les animaux. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1905, p. 1019.

20. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1904. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1905, p. 1050; *Lyon médical*, 31 décembre 1905.

21. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1905. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1906, p. 886; *Lyon médical*, 28 octobre 1906, p. 702.

22. Ch. Lesieur et M. Favre, Etude du liquide céphalo-rachidien dans deux cas de rage humaine; glycosurie rabique. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 5 novembre 1906; *Lyon médical*, 9 décembre 1906, p. 935.

23. J. Courmont et Ch. Lesieur, Etudes cliniques sur la rage humaine (syndrome de Landry, rage curable, rage chronique). *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 1906; *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1906, p. 1047.

24. P. de Giovanni, Contribution à l'étude des formes cliniques et du diagnostic de la rage humaine, suivie de recherches histologiques sur les lésions rabiques viscérales. *Thèse* de Lyon, 1906.

25. Ch. Perret, La leucocytose dans la vaccination antirabique. *Thèse* de Lyon, 1906.

26. Ch. Lesieur, Neutralisation du virus rabique par la bile et par les selles biliaires. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 29 décembre 1906, p. 694.

27. Ch. Lesieur et F. Barjon, Forme érotique de la rage humaine. Glycosurie rabique. *Bull. de la Soc. méd. des Hôp. de Lyon*, 15 janvier 1907; *Lyon médical*, 10 février 1907, p. 277.

28. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1906. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1907, p. 664; *Lyon médical*, 3 novembre 1907.

29. J. Nicolas et Ch. Lesieur, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1907. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1908, p. 915; *Lyon médical*, 20 décembre 1908.

30. Ch. Lesieur et L. Thevenot, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1908. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1909, p. 922.

31. Ch. Lesieur et L. Thevenot, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1909. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1910, p. 989.

32. Chattot et L. Thevenot, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1910 et 1911. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, juillet 1912, p. 802.

33. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1912. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, novembre 1913.

34. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1913. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, septembre 1914 (paru en 1916).

35. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1914. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, décembre 1915 (paru en 1916).

36. A. Rochaix et P. Durand, La réaction d'Abderhalden au cours d'une paralysie consécutive au traitement antirabique. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 21 octobre 1916.

37. H. Bardon, Paralysies consécutives au traitement antirabique. *Thèse* de Lyon, 1916.

38. A. Rochaix et P. Durand, Paralysie ascendante aiguë survenue au cours du traitement antirabique. *Arch. de méd. expérim.*, mars 1917.

39. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1915. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, mars 1917.

40. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1916. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, juillet 1917.

41. A. Rochaix, Nouvelle observation de paralysies consécutives au traitement antirabique. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, février 1919.

42. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1917. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1919.

43. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1918. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, juin 1919.

44. A. Rochaix, De la mastzellose, apparaît-elle au cours du traitement antirabique? *Exposé de titres et travaux*, mai 1920.

45. A. Rochaix, Le traitement antirabique dans la région lyonnaise en 1919. *Journ. de Physiol. et de Pathol. gén.*, 1920.

SUR LA FORMATION DES ANTICORPS A LA SUITE DES INJECTIONS DE MALLÉINE

par BROCQ-ROUSSEU, P. FORGEOT et A. URBAIN.

L'expérience de la guerre a mis en évidence la grande valeur de la réaction à la malléine, pour le diagnostic de la morve. L'intradermo-malléination, en particulier, s'est imposée comme une méthode rapide et sûre, ne nécessitant, pour son application aux armées en campagne, qu'un matériel d'une simplicité remarquable.

D'autres méthodes de diagnostic: fixation du complément, agglutination, précipitation, ont été employées dans les armées étrangères. On a recherché aussi la valeur de ces méthodes, comparée à celle de la malléination.

Olga R. Povitsky, ayant eu à examiner plus de 2.000 sérums, au cours d'une année, mit en œuvre, à la fois, l'agglutination, la réaction de fixation et l'intradermo-malléination, pour se rendre compte de la valeur de ces trois réactions. Dans 123 cas de morve, confirmés par l'autopsie, chacune de ces épreuves, utilisées séparément, a donné des résultats positifs dans 64,2 p. 100 pour l'agglutination, 75,6 p. 100 pour la fixation du complément, et 87,8 p. 100 pour l'intradermo-malléination (1).

Miessner et Trapp avaient antérieurement admis que la déviation du complément donnait 89,9 p. 100 d'indications positives (2).

Plus récemment, Poppe, se basant sur les données de trois années de campagne, préconise aussi la réaction de fixation

(1) OLGA R. POVITSKY. *Journ. of. Immun.*, **3**, novembre 1918, p. 463-479 (Dép. santé New-York).

(2) MIESSNER et TRAPP, Die Komplementbildung beim Rotz und ihre Beziehung zur Syphilisreaktion. *Centr. f. Bakt.*, **52**, 1909.

pour le diagnostic de la morve. Pour cet auteur, la réaction à la malléine aurait une valeur inférieure à la première (1).

Donc, s'il paraît définitivement reconnu que, dans une armée en campagne, la malléination est la méthode de choix, il ne faut pas nier toute valeur diagnostique à la déviation du complément. C'est une méthode de laboratoire qui, en temps de paix, peut apporter de précieux renseignements, dans le cas où le diagnostic est douteux.

Aussi, Rubinstein (2) conseille-t-il de combiner ces deux épreuves.

C'est ce qu'ont fait Mason et Emmons (3) qui essayèrent la fixation de l'alexine et l'agglutination avec le sérum de 94 chevaux ayant donné un résultat douteux à la réaction intrapalpébrale : 71 réactions furent positives à la déviation du complément, et 54 à l'agglutination. L'autopsie confirma ces faits : les 71 chevaux abattus furent trouvés porteurs de lésions morveuses.

On voit donc que, dans les cas douteux de morve, cette déviation peut être employée pour assurer le diagnostic.

Se basant sur ces faits, certains expérimentateurs voulurent associer systématiquement la malléination et la fixation, mais ils ne tardèrent pas à s'apercevoir qu'un obstacle sérieux se dressait devant eux : l'injection de malléine produisait, en effet, dans l'organisme, l'apparition d'anticorps qui fixaient l'alexine au même titre que les anticorps morveux spécifiques.

Miessner et Trapp (4) signalèrent les premiers que la « valeur de déviation » du sérum de chevaux, morveux ou non, croît après une injection de malléine. Ils indiquèrent que cette surproduction d'anticorps, quoique passagère, peut être la cause d'erreurs.

Ciuca (5) mit en évidence, dans le sang des animaux de laboratoire, traités par la malléine, des anticorps malléiniques,

(1) Poppe. *Berl. Tierarzt. Woch.*, **35**, 1919, n° 21, p. 173-175.

(2) M. Rubinstein. *Traité pratique de sérologie*, Paris, 1921, p. 291.

(3) E. H. Mason and R. V. B. Emmons, The value of the intrapalpebral mallein test in the diagnostic of glanders. *Journ. of Immun.*, **5**, 1920, p. 489-497.

(4) *Loc. cit.*

(5) Ciuca, Anticorps antimalléiniques et fixation du complément dans l'hypersensibilisation par la malléine. *C. R. Soc. de Biol.*, 1910, p. 77.

en utilisant comme antigène une solution très diluée de malléine (1 p. 5.000). Ces anticorps apparaissent trois jours après l'injection.

Zurkan (1) fit les mêmes constatations que Miessner et Trapp, à l'occasion d'injections sous-cutanées d'antigènes morveux non virulents.

E. M. Robinson (2), en 1918, résuma, dans un long rapport, les résultats qu'il avait obtenus, en employant, comme méthode de diagnostic, la déviation du complément, conjointement avec la malléination. Plus de 1.600 épreuves furent pratiquées de juin 1914 à 1916. La fixation de l'alexine ne fut plus employée à partir de 1916, par suite de l'inexactitude des résultats obtenus avec les chevaux ayant été malléinés antérieurement. Les réactions positives obtenues avec la déviation furent si nombreuses, que Robinson jugea inutile de continuer l'emploi de cette méthode. Il conclut en faisant ressortir le manque de certitude de cette réaction lorsque les chevaux ont été déjà malléinés, même si un mois s'est écoulé depuis la dernière malléination, à moins que cette malléination ait été la première et non la dernière d'une série.

En 1920, Kelser et Hardenberg (3) étudièrent les effets de l'intradermo-malléination sur l'épreuve consécutive de la fixation du complément pour le diagnostic de la morve. Ils arrivèrent aux conclusions suivantes : l'injection intradermique de 0 c. c. 1 de malléine diluée au 1/4 provoque, chez 83 p. 100 des animaux qui n'ont jamais été malléinés, la production d'anticorps; tandis que chez ceux qui ont été antérieurement malléinés elle ne donne qu'un pourcentage de 33 p. 100. Les anticorps peuvent être mis en évidence vingt-quatre heures après l'injection de malléine, et ils persistent parfois trente-deux jours après cette injection. En moyenne, l'animal développe la sensibilisatrice spécifique quatre à sept jours après la

(1) Zurkan, La formation d'anticorps spécifiques dans le sang du cheval, sous l'action de l'antigène morveux. *Diss. Kharkoff*, 1911.

(2) E. M. Robinson, Valeur de l'épreuve de la fixation du complément dans le diagnostic de la morve. *78e Report of the director of veterinary researches*, août 1918, Le Cap, 1920.

(3) R. A. Kelser et J. C. Hardenberg. *Journ. Amer. vet. med. assoc.*, 57, 1920, n° 3, p. 288-292.

malléination, et cette sensibilisatrice persiste environ deux semaines après son apparition.

La conclusion à tirer de ces quelques travaux est que, effectivement, les injections de malléine provoquent l'apparition d'anticorps qui gênent, masquent ou contrarient la réaction de fixation de l'alexine. Mais ces documents manquent de précision, surtout au point de vue de la durée de ces anticorps, et de nouvelles recherches s'imposent pour fixer les points obscurs, en considérant que nos animaux ont déjà subi des épreuves antérieures à la malléine.

* * *

Dans ce travail, nous avons recherché :

1° Si l'injection de malléine provoquait la formation d'anticorps dans l'organisme du cheval injecté;

2° Dans quelles limites de temps, après la malléination, la réaction de fixation du complément devait être faite, pour que ses indications soient considérées comme exactes.

Avant d'entrer dans le détail des expériences, nous allons exposer la technique employée dans ces recherches.

TECHNIQUE

La mise en pratique d'une réaction de fixation nécessite la préparation d'un certain nombre d'éléments, à savoir : le sérum à étudier, l'antigène, l'alexine, une émulsion d'hématies lavées, un sérum hémolytique. Nous fixerons certains points les concernant.

Sérum a étudier. — Pour l'obtenir, il faut prélever aseptiquement, dans un tube stérile, 30 à 35 cent. cubes de sang, par ponction de la jugulaire ; le tube est laissé à la température du laboratoire. Le lendemain, on décante le sérum formé, on le recueille aseptiquement dans un tube à essai qu'on plonge pendant trente minutes dans un bain-marie à 60°. Cette température est nécessaire, non seulement pour détruire l'alexine, inactivée à 55°, mais aussi pour enlever au sérum des

substances particulières ayant la même action que le complément, et ne disparaissant qu'à cette température élevée (1).

Shirnoff conseille même de chauffer le sérum pendant une heure quinze à 60° (2). Nous avons reconnu, au cours de nos recherches, que ce chauffage à 60° rend la réaction beaucoup plus sensible, dans le cas où le taux des anticorps est peu élevé. Buxton (3) recommande, dans le cas du sérum de mulet, de chauffer à 62° pendant quinze minutes; ce chauffage n'altère pas les anticorps.

Antigène. — Après de nombreux essais, nous avons utilisé comme antigène la préparation suivante : à 20 cent. cubes d'eau physiologique à 9 pour 1000, on ajoute 2 centigr. de corps microbiens tués, provenant de cultures ayant servi à la fabrication de la malléine. Pour débarrasser les bacilles morveux de l'excès de glycérine qu'ils possèdent, on centrifuge l'émulsion ; le liquide surnageant est décanté, et on le remplace par un égal volume d'eau physiologique. Cette opération est recommencée deux fois. La suspension microbienne est ensuite portée à l'ébullition pendant cinq minutes. Nous avons aussi employé une émulsion faite avec des microbes préparés par l'alcool-éther. Nous sommes partis d'une culture abondante en bouillon glycériné, âgée de six jours ; les bacilles ont été tués par un chauffage de deux heures au bain-marie à 60°. Les germes, réunis par centrifugation, sont débarrassés de leur excès de glycérine, par deux lavages succédant à deux centrifugations. Le culot obtenu est déshydraté par l'alcool ; on ajoute ensuite partie égale d'éther. On laisse agir le mélange vingt-quatre heures ; on décante le liquide surnageant, et les corps microbiens sont mis à dessécher dans une boîte de Petri, soit à l'étuve, soit dans le vide sulfurique. Les germes secs sont broyés dans un tube métallique, avec des billes de bronze par agitation mécanique, ou dans un mortier d'agate. On les

(1) Wladimiroff, Malleus ; *in* Kolle et Wassermann. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, **5**, 1913, p. 1162.

(2) A. J. Shirnoff, Valeur de la réaction de fixation pour le diagnostic de la morve. *Russky Wratsch.*, 1909.

(3) J. B. Buxton, The temperature required for the inactivation of mule blood for the complement fixation test for glanders. *Veter. Journ.*, juillet 1917.

emploie en émulsion, à raison de 1 centigramme pour 50 cent. cubes d'eau physiologique. On obtient ainsi un antigène sensiblement aussi actif que le précédent, et qui a le précieux avantage de se conserver indéfiniment, à condition de le mettre à l'abri de l'humidité.

Quant à la malléine elle-même, diluée au taux indiqué par Ciuca (1), elle n'a pas toujours, comme antigène, une valeur constante : les résultats obtenus avec le même sérum, et dans des conditions identiques de réaction, n'étant pas comparables entre eux. Nous l'avons donc abandonnée, dès nos premières recherches.

Alexine. — Nous avons utilisé exclusivement le sérum frais de cobaye dilué au 1/15e et dont le titrage était fait au moment de chaque réaction.

Hématies lavées. — Nous nous sommes servis uniquement de globules de mouton. Les hématies doivent être lavées trois fois avec beaucoup de soin, pour enlever les substances antihémolytiques du sérum qui pourraient adhérer à leurs parois. Ces globules sont employés en suspension à 5 p. 100, dans de l'eau physiologique.

Sérum hémolytique. — Nous avons obtenu un bon sérum hémolytique vis-à-vis des hématies de mouton, en injectant sous la peau d'un cheval 15 cent. cubes de ces globules préalablement lavés quatre ou cinq fois. Cette injection est ensuite répétée toutes les semaines à la dose de 20 cent. cubes. Il nous a fallu six semaines pour avoir un sérum actif. Ce sérum, inactivé par un chauffage à 56°, pendant trente minutes, est titré chaque fois, avant son emploi.

Technique de la réaction. — Nous avons suivi celle qui est appliquée au laboratoire de M. Besredka à l'Institut Pasteur, et qui consiste à employer une dose constante d'antigène et de sérum, et une quantité variable d'alexine. Le dispositif que nous avons adopté est le suivant : on utilise un portoir à deux

(1) Ciuca, *loc. cit.*

étages; l'inférieur porte une série de six tubes qui reçoivent chacun :

a) 2/10 de cent. cube du sérum à examiner;
b) 3/10 de cent. cube d'antigène;
c) la solution d'alexine à doses croissantes, c'est-à-dire 1/10 de cent. cube dans le premier tube, 2/10 de cent. cube dans le deuxième, 6/10 dans le sixième.

En regard de ces six tubes renfermant le mélange antigène-sérum alexine, on dispose, à l'étage supérieur du portoir, quatre tubes témoins qui renferment des quantités équivalentes de sérum, et d'alexine, moins l'antigène. Ils serviront au contrôle du sérum et permettront de voir s'il renferme des substances anticomplémentaires, susceptibles de gêner l'hémolyse. Une autre série de cinq tubes reçoit les mêmes doses d'antigène et d'alexine, sans sérum, afin de juger si l'antigène n'est pas empêchant, c'est-à-dire s'il ne fixe pas le complément. Enfin, une dernière série de cinq tubes reçoit l'alexine à doses croissantes, sans antigène ni sérum; ce sera le contrôle du complément qui nous renseignera sur son degré d'activité et de celui du système hémolytique, en général.

Les tubes de ces quatre séries sont ensuite complétés à 1 c. c. 1 avec de l'eau physiologique. Ils sont ensuite portés à l'étuve à 37°, pendant une heure, puis laissés à la température du laboratoire pendant une autre heure. On ajoute ensuite les globules préalablement sensibilisés à raison de 1 cent. cube par tube; on met de nouveau trente minutes à l'étuve, puis, on procède à la lecture des résultats.

On met à profit l'intervalle de deux heures qui existe entre la première mise à l'étuve et la répartition des globules, pour titrer le sérum hémolytique. Nous avons toujours employé une dose deux fois plus forte que la dose hémolyse-limite obtenue.

EXPÉRIENCES

Nous avons expérimenté sur dix chevaux n'ayant pas reçu d'injection de malléine depuis six mois. Une prise de sang préalable montra que le sérum de ces animaux ne possédait

pas de sensibilisatrice fixant l'alexine en présence d'antigène morveux.

Nos expériences ont été conduites de la façon suivante : cinq de ces chevaux furent soumis à une intradermo-malléination, c'est-à-dire qu'ils reçurent 0 c. c. 1 de malléine au quart; les cinq autres furent éprouvés par une malléination sous-cutanée ; ils reçurent 2 c. c. 5 de malléine au 1/10. Dans une première expérience, nous avons simplement recherché si ces injections de malléine produisaient des anticorps dans l'organisme. Dans les suivantes nos recherches ont porté sur la date d'apparition et sur la date de disparition de ces anticorps. Nous avons envisagé, en dernier lieu, l'action des malléinations successives et l'influence de la dose de malléine employée sur la formation de la sensibilisatrice.

Expérience I. — **Formation des anticorps.**

Dans cette expérience, nous avons déterminé si l'injection de malléine donne lieu à la formation d'anticorps spécifiques. La moitié des chevaux reçut une intradermo-malléination, l'autre moitié reçut une malléination sous-cutanée. Le tableau suivant donne le résultat de la recherche des anticorps, pratiquée huit jours après les malléinations :

Matricule	658	Intradermo,	le 6 mars	0
—	140	—	—	0
—	80	—	—	+
—	31	—	—	0
—	114	—	—	+
—	663	Sous cutanée,	le 6 mars . . .	+
—	683	—	— . . .	+
—	1.085	—	— . . .	+
—	649	—	— . . .	+
—	188	—	— . . .	0

La conclusion de cette première expérience est donc que deux chevaux sur cinq, après une première intradermo-malléination, et quatre sur cinq après une première malléination sous-cutanée, ont présenté dans leur sérum une sensibilisatrice spécifique.

Expérience II. — **Apparition et disparition des anticorps.**

Les données de cette expérience sont fournies par le tableau suivant :

MATRICULES	DATE ET NATURE DES MALLÉINATIONS	APPARITION DES ANTICORPS		DISPARITION DES ANTICORPS	
		Date	Temps nécessaire	Date	Temps écoulé depuis la malléination
658	Intradermo, 11 avril. . . .	0	0	0	0
140	— —	0	0	0	0
80	— —	17 avril.	6 jours,	9 mai.	28 jours
31	— —	0	0	0	0
114	— —	15 avril.	4 jours.	11 mai.	30 jours.
663	Sous-cutanée, 11 avril. . .	19 —	8 —	11 —	30 —
683	— — . . .	19 —	8 —	3 —	22 —
1.085	— — . . .	15 —	4 —	15 —	34 —
649	— — . . .	17 —	6 —	11 —	30 —
188	— — . . .	19 —	8 —	11 —	30 —

Comme dans la première expérience, les trois chevaux 658, 140, 31, n'ont pas présenté d'anticorps dans leur sérum ; par contre, ceux-ci sont décelés dans le sang des autres chevaux de quatre à huit jours après l'injection de malléine, et ils disparaissent du vingt-deuxième au trente-quatrième jour après cette injection.

Expérience III. — **Influence des malléinations successives.**

MATRICULES	DATE ET NATURE DES MALLÉINATIONS	APPARITION DES ANTICORPS		DISPARITION DES ANTICORPS	
		Date	Temps nécessaire	Date	Temps écoulé depuis la malléination
658	Intradermo, le 19 mai. . .	0	0	0	0
140	— — . . .	0	0	0	0
80	— — . . .	25 mai.	6 jours.	25 juin.	37 jours.
31	— — . . .	0	0	0	0
114	— — . . .	23 mai.	4 jours.	19 juin.	31 jours.
664	Sous-cutanée, le 19 mai. .	23 —	4 —	25 —	37 —
683	— — . .	25 —	6 —	29 —	41 —
1.085	— — . .	23 —	4 —	17 —	29 —
649	— — . .	23 —	4 —	17 —	29 —
188	— — . .	23 —	8 —	13 —	25 —

Cette expérience, tout en servant de contrôle à la précédente, a eu pour objet de voir si la succession des injections de malléine agissait sur la formation des anticorps.

Nous résumons dans le tableau ci-dessus les résultats obtenus.

La conclusion à tirer de cette troisième expérience est que trois injections successives de 0 c. c. 1 de malléine au 1/4 n'ont pas donné lieu à la formation d'anticorps dans le sérum des chevaux 658, 140 et 31.

Dans le groupe des animaux ayant reçu une malléination sous-cutanée nous voyons que le 188, qui n'avait pas d'anticorps après la première malléination, en a présenté dès la deuxième. L'influence de deux malléinations successives est donc très nette.

Comme précédemment, la sensibilisatrice a été mise en évidence du quatrième au sixième jour. Elle a disparu du vingt-quatrième au quarante et unième.

Les chevaux 658, 140, 31 ont été éprouvés une quatrième fois, le 30 mai, par une nouvelle intradermo. Pas plus que précédemment, cette injection n'a déterminé la formation d'anticorps. La succession de quatre injections de 0 c. c. 1 de malléine au quart n'a donc eu aucune influence sur la formation de la sensibilisatrice.

Il y aurait lieu de chercher combien il faudrait d'injections palpébrales successives pour déterminer l'apparition d'anticorps. Cette expérience sera faite ultérieurement ; pour l'instant elle ne nous a pas apparu comme ayant un caractère d'urgence, puisque nous pouvons avoir ces anticorps par une injection sous-cutanée et les obtenir à coup sûr.

Expérience IV. — **Influence de la dose de malléine.**

Les chevaux 658, 140 et 31 qui, après quatre intradermo-malléinations n'ont pas fait d'anticorps, sont soumis, le 13 juin, à une malléination sous-cutanée; ils reçoivent 2 c. c. 5 de malléine au 1/10. Le 17 juin, c'est-à-dire quatre jours après cette injection, la sensibilisatrice est mise en évidence dans le sérum.

Le facteur dose joue donc un rôle important dans l'apparition des anticorps, puisque la malléination sous-cutanée, qui introduit dix fois plus de malléine brute dans l'organisme que l'intradermo, détermine la formation de la sensibilisatrice.

Expérience V. — **Durée des anticorps.**

Nous avons vu, précédemment, que les anticorps pouvaient disparaître quarante et un jours seulement après la malléination. Deux chevaux 1085 et 683 reçurent le 6 juillet une quatrième malléination sous-cutanée. Les anticorps apparurent le quatrième jour, et le 20 août, soit quarante-cinq jours après, la réaction de déviation fut négative.

On peut donc être sûr que, après quarante-cinq jours, il n'y a plus d'anticorps chez les animaux injectés de malléine ; la durée la plus longue que nous ayons observée étant de quarante et un jours.

Expérience VI. — **Richesse en anticorps des animaux malléinés.**

Nous avons adopté la méthode de Calmette et Massol pour la numération des unités d'anticorps (1). Si un volume V, du sérum à étudier, dévie N doses minima de complément, le rapport $\frac{N}{V}$ représente le nombre de doses minima de complément que peut dévier 1 cent. cube de sérum. L'unité d'anticorps correspond à la quantité de sensibilisatrice capable de dévier une dose d'alexine.

A. Richesse en anticorps chez les animaux sains. — Le tableau suivant donne le résultat de ces examens :

	Malléination le 11 avril			
	Par intradermo		Sous-cutanée	
	Matricule 114	Matricule 80	Matricule 663	Matricule 1085
15 avril.	10 unités.	0 unités.	0 unités.	10 unités.
17 —	10 —	10 —	0 —	10 —
19 —	15 —	20 —	20 —	25 —
21 —	15 —	20 —	15 —	25 —
23 —	25 —	25 —	25 —	80 —
25 —	25 —	25 —	25 —	25 —
27 —	10 —	15 —	10 —	20 —
29 —	10 —	5 —	15 —	20 —
1er mai	5 —	5 —	10 —	15 —
3 —	5 —	5 —	10 —	15 —
5 —	5 —	5 —	10 —	15 —
7 —	5 —	5 —	5 —	10 —
9 —	5 —	5 —	5 —	10 —
11 —	0 —	0 —	0 —	5 —
13 —	0 —	0 —	0 —	5 —
15 —	0 —	0 —	0 —	0 —

(1) Calmette et Massol. *C. R. Soc. de Biol.*, 6 janvier 1912.

Nous voyons donc que le taux moyen le plus élevé a été de 25 unités. Une seule fois, exceptionnellement, ce taux a été porté à 80. Le taux de la sensibilisatrice est donc généralement faible chez les animaux sains.

B. Richesse en anticorps des animaux morveux. — Nous avons, en outre, recherché si la malléine produit, chez les animaux morveux, les mêmes effets que la tuberculine chez les animaux tuberculeux, c'est-à-dire augmentait d'une façon notable la richesse en anticorps de leur sérum (1).

Nous prendrons deux exemples chez deux chevaux abattus pour morve : cheval Moka du 33e d'artillerie, et jument 283 de l'annexe de remonte de Bec-Hellouin.

Cheval Moka. — Ce cheval avait présenté des réactions douteuses à la malléine aux dates suivantes :

8 et 10 décembre 1920, intradermo-malléinations ; 13 décembre 1920, 14 janvier, 21 février 1921, malléinations sous-cutanées.

Des prises de sang, faites tous les huit jours, après le 21 février ont donné les résultats suivants :

1er mars	250 unités.
8 —	250 —
15 —	150 —
22 —	50 —
2 avril	50 —
Du 5 avril au 24 mai. . .	25 —

La dernière prise de sang (21 mai) faite trois mois après la dernière malléination (21 février) ayant montré la présence d'anticorps, ceux-ci ne purent être attribués à l'action de la malléine, puisque nous savons que cette action ne dépasse pas quarante-cinq jours. Le cheval, considéré comme morveux, fut abattu le 24 juin. L'autopsie confirma le diagnostic ; on trouva des tubercules des poumons et des ulcérations des cornets. La mise en culture du produit de broyage des ganglions préthoraciques mit en évidence un bacille ayant les caractères du bacille de la morve.

Jument 283. — Cette jument avait reçu, à la date du 1er mai, 2 intradermo-malléinations et 5 malléinations sous-cutanées. Les taux d'anticorps furent les suivants :

2 mai	100 unités.
14 —	150 —
21 —	150 —
1er juin	100 —
Du 15 juin au 15 juillet. .	20 —

Dans les deux cas, le taux des anticorps, chez ces animaux morveux, a monté de 150 et 250 unités, alors que chez les

(1) A. Calmette, L. Massol et A. Mezie, Recherche et dosage des sensibilisatrices tuberculeuses ou anticorps au cours de la tuberculinothérapie par diverses tuberculines. *C. R. Soc. de Biol.*, 15 juillet 1912, p. 122.

animaux sains le taux moyen n'est que de 25. La malléine se conduit donc comme la tuberculine : elle augmente d'une façon très notable le taux des anticorps, chez les animaux morveux.

Cette notion nouvelle paraît devoir être prise en sérieuse considération lorsqu'il s'agira de poser un diagnostic de morve dans un cas douteux.

CONCLUSIONS

1° L'injection intradermique de 0 c. c. 1 de malléine au quart, répétée quatre fois, à intervalles réguliers, n'a donné lieu à l'apparition d'anticorps que dans deux cas sur cinq, soit dans une proportion de 40 p. 100.

2° Une première injection sous-cutanée de 2 c. c. 5 de malléine au dixième fait apparaître une sensibilisatrice dans le sang de quatre chevaux sur cinq, soit une proportion de 80 p. 100. Après une deuxième injection, les anticorps apparaissent d'une façon constante.

3° Les chevaux, qui ne possèdent pas d'anticorps après quatre malléinations palpébrales successives, en présentent quatre jours après une malléination sous-cutanée ; ils reçoivent, en effet, dans ce cas, une dose de malléine brute dix fois supérieure à celle des premières injections.

4° Les anticorps formés dans l'organisme, soit après une intradermo-malléination, soit après une malléination sous-cutanée, apparaissent du quatrième au huitième jour après l'injection de malléine. Ils disparaissent toujours après le quarante-cinquième jour.

5° Chez les animaux morveux, la richesse en anticorps de leur sérum est augmentée d'une façon notable par l'injection de malléine.

La conclusion pratique de ce travail est la suivante :

Si l'on veut associer la déviation du complément à la malléine, pour le diagnostic de la morve, il faut prélever le sang immé-

diatement après la malléination, et de toute façon avant le quatrième jour qui suit, ou bien quarante-cinq jours après.

La prise de sang devrait évidemment être faite la veille de la malléination ; mais la prise faite le lendemain le sera dans le cas où la malléination aurait donné une réaction douteuse ; ce qui est le cas général nécessitant une fixation de complément.

(Institut Pasteur et Laboratoire militaire de recherches vétérinaires.)

ANTICORPS EXPÉRIMENTAUX CHEZ LES VÉGÉTAUX

par C. PICADO.

Les végétaux peuvent-ils produire des anticorps à la suite des inoculations d'antigènes appropriés ?

D'après Noël Bernard (1) les orchidées produiraient dans leurs bulbes des anticorps contraires aux champignons endophytes de la racine; ces anticorps contribueraient à cantonner dans les racines le champignon et l'empêcheraient d'envahir le reste de la plante; ceci, bien entendu, seulement comme adjuvant à la fonction phagocytaire de certaines cellules des racines. A l'appui de cette interprétation, Noël Bernard cite cette expérience : si l'on introduit, dans la gélose de culture, de petits morceaux du bulbe de l'orchidée, et si l'on sème alors le champignon endophyte dans ces tubes, on voit le mycélium s'arrêter avant d'arriver aux morceaux de bulbe, comme si ceux-ci sécrétaient, en auréole, des substances antagonistes que l'on pourrait comparer aux anticorps des animaux.

Mais on n'a jamais réussi à produire des anticorps expérimentaux chez les végétaux, et je ne sais si l'on a jamais tenté de les produire.

Dans le but d'établir s'il y aurait production d'anticorps chez les végétaux, j'ai institué une série d'expériences dont voici les résultats :

Comme sujet d'expérience j'ai choisi une Cactée du genre *Opuntia*; les branches, en forme de raquette, mesurent 20 à 30 centimètres de longueur, 10 à 15 centimètres de largeur et 1 à 3 centimètres d'épaisseur. Une de ces raquettes peut vivre longtemps, et même bourgeonner dans n'importe quel endroit. Sa consistance grasse se prête parfaitement à l'injection à l'aide d'une seringue ordinaire (fig. 1).

(1) Noël Bernard, Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées. *Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e série, **14**, 1911, p. 223.

Il est très facile, en outre, d'extraire par pression une quantité assez notable (quelques centimètres cubes) de liquide.

Etant donné que l'hémolyse est un des phénomènes les plus faciles à suivre, nous avons injecté des globules de lapin lavés dans l'eau glucosée à 3,5 p. 100 (car le NaCl serait toxique pour la plante). Au bout de huit jours nous avons obtenu, par pression, le liquide des zones saines qui limitaient les parties injectées. Nous n'avons rien obtenu. Dans une autre expérience

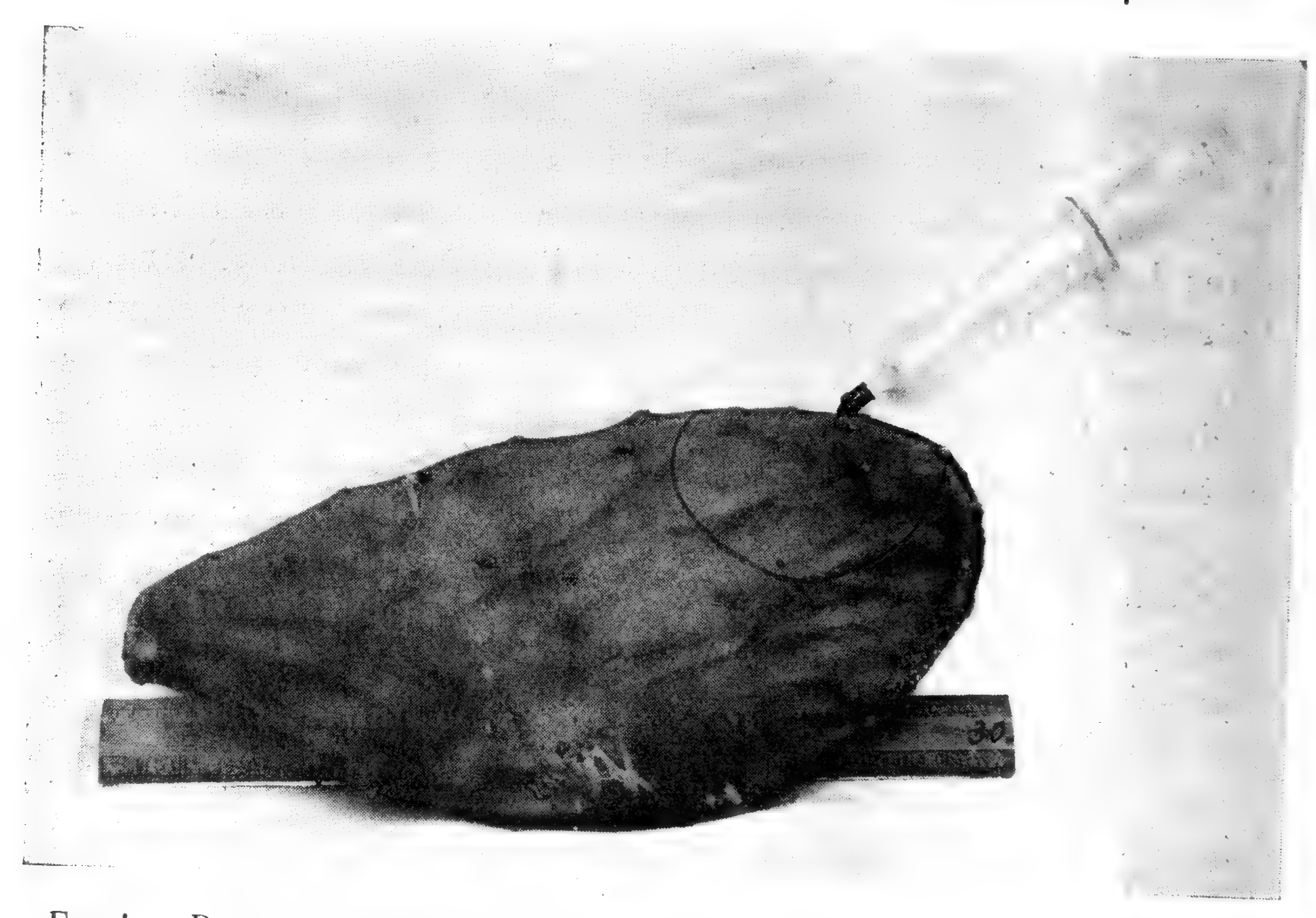


Fig. 1. — Raquette d'*Opuntia* injectée avec 10 c.c. de liquide. La ligne marque la zone intéressée par l'injection. En bas, règle de 30 centimètres.

nous avons injecté pendant cinq semaines (une injection par semaine) une autre raquette d'*Opuntia*: même résultat négatif.

Nous nous sommes proposé alors de voir si, en employant comme antigène des cellules végétales, on pourrait obtenir un résultat positif. La première expérience a été faite en inoculant des levures, mais les résultats ont été encore négatifs; la levure continuait à vivre à l'intérieur des tissus de l'*Opuntia*. Si l'on mélangeait *in vitro*, le suc d'*Opuntia* injecté à une émulsion de levure, celle-ci ne changeait en rien, se comportait comme une émulsion témoin traitée par du jus d'*Opuntia* neuve. Si l'on porte ces levures (après un contact de vingt-quatre heures

avec le suc de la plante), dans de l'agar glucosé, le développement se fait très normalement.

Il fallait donc trouver des cellules végétales vivantes, mais ne se reproduisant pas. C'est alors que nous avons pensé au pollen. Comme c'était l'époque de la floraison du maïs et que cette espèce se prête à une récolte abondante et facile de pollen, c'est elle que nous avons choisie.

Nous avons fait une suspension, dans l'eau stérile, des grains de pollen de maïs (au contact de l'eau ils éclatent) ; avec cette

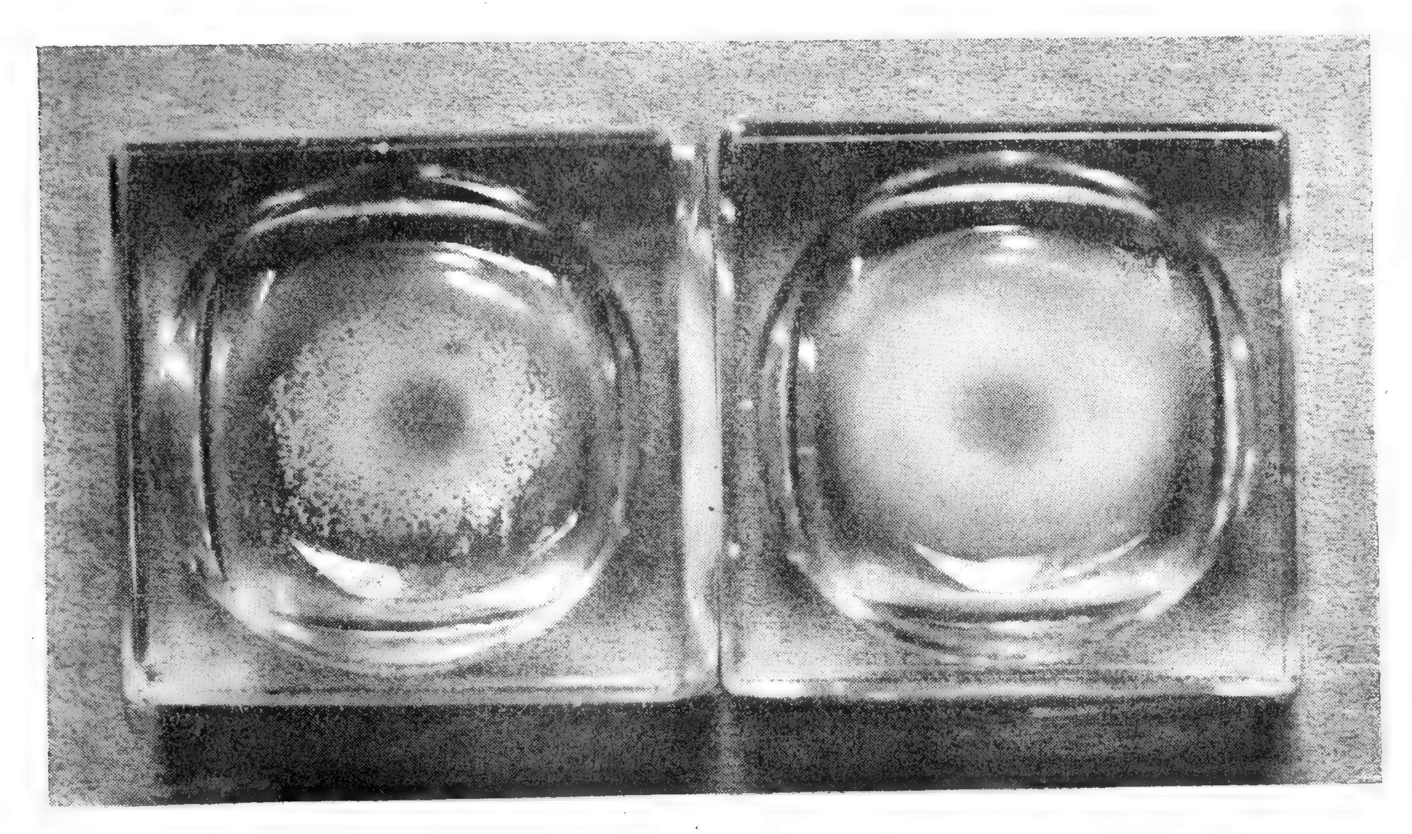


Fig. 2. — Action du jus « *Opuntia* anti-maïs » sur le pollen de maïs. A droite, témoin traité par jus neuf.

émulsion on injecte tout le pourtour d'une raquette d'*Opuntia*. Huit jours après, les tissus injectés deviennent jaunes et friables ; on extrait le jus en pressant les morceaux entre les doigts, ou en mettant dans un linge les morceaux et pressant ensuite ; on filtre sur coton et on centrifuge. On prépare de la même manière, et pour servir comme témoin, du jus d'*Opuntia* neuve. D'autre part nous avons préparé une émulsion de pollen de maïs dans de l'eau glucosée à 10 p. 100. Cette concentration est trois fois plus forte que celle supportée par les grains de pollen. Dans deux cristallisoirs on met de l'émulsion de pollen de maïs (1 cent. cube de pollen dans 20 cent. cubes d'eau glucosée à 10 p. 100), à raison de V gouttes d'émulsion par cristallisoir. Dans le premier on ajoute V gouttes du jus

d'*Opuntia* injectée, dans l'autre du jus d'*Opuntia* neuve; on agite, et au bout de quelque temps, une à deux heures généralement, on voit l'aspect présenté par la figure 2. Le pollen traité par le jus de la plante injectée *est lysé et agglutiné à la fois.* L'aspect macroscopique rappelle beaucoup une réaction de Widal fortement positive.

Si l'on met entre lame et lamelle une goutte des mélanges de chaque cristallisoir, on peut assister à la lyse des grains de pollen. Dans un cas nous avons compté une lyse de 12 p. 100 pour le pollen traité par le jus de plante inoculée, tandis que dans le pollen traité par du jus de plante neuve il y avait à peine 1 p. 100 des grains qui éclataient.

Pour avoir une première idée de la force lytique et agglutinante, nous avons préparé un rameau d'*Opuntia* avec du pollen de maïs. Cette fois, nous avons fait la suspension, non dans de l'eau pure, mais dans de l'eau glucosée à 10 p. 100 et préalablement stérilisée. Ceci dans le but d'éviter la lyse possible du pollen résultant d'une trop grande dilution du jus de la plante inoculée. Une semaine après, on met dans plusieurs cristallisoirs VIII gouttes d'une suspension de pollen dans la même eau glucosée à 10 p. 100. Dans le premier on ajoute VIII gouttes de suc de plante traitée, dans l'autre IV gouttes, et dans le troisième, seulement II gouttes. On établit un témoin avec VIII gouttes de plante neuve. Au bout d'une heure et demie nous avons une lyse et agglutination très marquée avec VIII gouttes. On la voit encore très bien avec IV, mais avec II gouttes elle est à peine perceptible. Dans le témoin, le pollen reste intact.

Pour savoir si un traumatisme quelconque serait capable de développer cette propriété lytique et agglutinante vis-à-vis du pollen de maïs, nous avons inoculé plusieurs rameaux d'*Opuntia* avec des produits divers : levures, microbes, sérums, etc. Les jus de plantes ainsi traitées sont sans action sur le pollen de maïs (1).

Dans une autre expérience nous avons étudié la spécificité de ces agglutinines et cytolysines (que nous nommerons *polleno-*

(1) Il faut remarquer que le jus neuf agglutine plusieurs espèces bactériennes.

lysines). Le jus de plante inoculée avec le pollen de maïs est mis en contact avec des pollens d'autres espèces. Nous avons constaté alors que, tandis que le jus est inactif vis-à-vis du

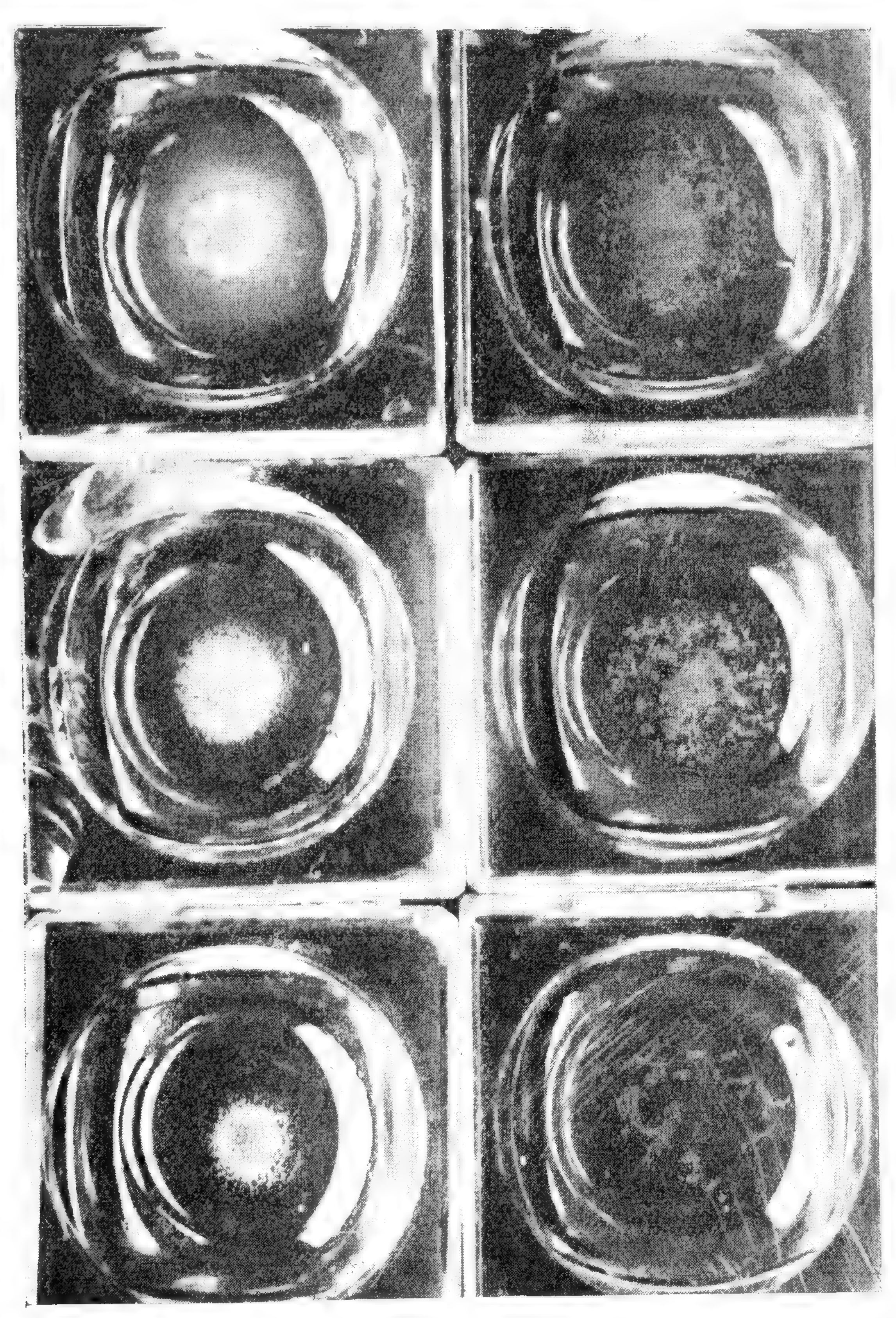


FIG. 3. — Action du jus « *Opuntia* anti-maïs » sur divers pollens . maïs en haut; *Coix* au centre; à gauche, témoins traités par jus neuf.

pollen des espèces éloignées, tel le lis, par exemple, il agglutine fortement et lyse le pollen d'autres graminées ; la figure 3 nous montre en haut la cytolyse et agglutination du pollen de maïs (à gauche témoin); au milieu pollen de *Coix*

lacrymajobi, et en bas pollen d'une espèce de *Sorghum* (les grains de pollen de ces deux dernières espèces sont beaucoup plus petits; les grains de pollen de maïs mesurent 1/10 de millimètre de diamètre, tandis que ceux des autres espèces arrivent à peine à la moitié).

Si l'on examine au microscope ces divers cristallisoirs, on observe que les phénomènes ne sont pas absolument superposables. Tandis qu'avec le pollen de maïs il y a à la fois lyse et agglutination bien marquées, avec celui de *Coix* à grains plus petits il y a une forte agglutination et une lyse à peine marquées; avec le pollen de *Sorghum*, à grains un peu plus petits, on voit seulement l'agglutination avec lyse nulle.

Ces faits doivent être bien retenus, car ils nous serviront, non seulement pour suivre la spécificité de ces anticorps, mais encore pour expliquer d'autres phénomènes. Pour le moment nous retiendrons que la cytolyse est plus spécifique que l'agglutination.

Cette expérience a été réalisée avec du jus de plante injectée six jours auparavant, et en une heure.

Les pollenolysines peuvent être décelées le quatrième jour après l'inoculation. Si l'on chauffe le jus pollenolytique une demi-heure à 56° on voit que les pollenolysines ont disparu. Pour nous rendre compte de la thermolabilité de ces anticorps et en même temps pour savoir s'il y avait une alexine, nous avons institué l'expérience suivante :

Cristallisoir n° 1. — Reçoit V gouttes d'une émulsion de pollen lavé dans l'eau glucosée à 10 p. 100 et X gouttes de jus d'*Opuntia* injectée, mais chauffé trente minutes à 56°.

— 2. — Reçoit même quantité d'émulsion de pollen, V gouttes de jus inactivé à 56° + V gouttes de jus d'*Opuntia* neuve.

— 3. — Comme le n° 1, mais le chauffage à 56° a été seulement de quinze minutes.

— 4. — Comme le n° 2, mais l'inactivation à 56° de quinze minutes.

— 5. — Comme le n° 1, mais l'inactivation a été de trente minutes à 45°.

— 6. — Comme le n° 2, mais inactivé trente minutes à 45°.

— 7. — Comme le n° 1, mais l'inactivation a été de quinze minutes à 45°.

— 8. — Comme le n° 2, mais inactivation de quinze minutes à 45°.

— 9. — Reçoit aussi les mêmes V gouttes d'émulsion de pollen, mais X gouttes de jus d'*Opuntia* injectée sans être préalablement inactivé.

Cristallisoir n° 10. — Comme le n° 9, mais avec X gouttes de jus de plante neuve.

Au bout de quarante-cinq minutes le cristallisoir n° 9 présente déjà lyse et agglutination. Il ne se produit rien dans les autres. Au bout de deux heures on n'aperçoit encore aucune modification.

On laisse au repos jusqu'au lendemain. Au bout de dix-huit heures on observe les résultats suivants :

Les cristallisoirs ayant reçu du jus inactivé une demi-heure à 56° (n°s 1 et 2) ne montrent aucune modification, même si ce jus est en présence de jus de plante neuve.

Le jus inactivé quinze minutes à 56° *ne produit pas de pollenolyse* (n° 3); mais ce même jus, en présence de jus de plante neuve (n° 4), *commence à produire la lyse*, celle-ci est à peine perceptible à l'œil nu, mais au microscope on voit très bien la lyse et l'agglutination.

Le cristallisoir (n° 6), ayant reçu le mélange à parties égales de jus inactivé une demi-heure à 45° et de jus neuf, se comporte comme le mélange à parties égales de jus inactivé quinze minutes à 56° et de jus neuf (n° 4).

Le chauffage à 45°, pendant quinze minutes, ne fait que ralentir l'effet des pellenolysines sans les détruire, puisque au bout de dix-huit heures elles manifestent leur activité (cristallisoirs 7 et 8).

Le tableau ci-joint résume ces expériences.

En examinant ce tableau, on est conduit à supposer qu'il y a une agglutinine thermolabile, mais que cette agglutinine peut réapparaître en présence de jus d'*Opuntia* neuve qui remplirait ici le rôle d'une alexine. Ce qui se passe en réalité, c'est que les grains de pollen de maïs sont *trop gros pour être agglutinés sans être préalablement lysés*. Rappelons-nous que les petits grains de pollen de *Coix* et de *Sorghum* peuvent être agglutinés sans être lysés. Pour le cas du pollen de maïs, ce sont les leucites, mis en liberté à la suite de la lyse, qui sont agglutinés.

Nous avons inoculé plusieurs fois du pollen de lis aux rameaux d'*Opuntia*. Généralement on obtient le ramollissement des tissus, qui bientôt sont envahis par des microbes. Le pollen du lis ne se prête donc pas à ces expériences, car il est très toxique pour l'*Opuntia*. Dans de rares occasions nous avons

Influence sur le pollen de maïs du jus d'*Opuntia* inoculée et d'*Opuntia* neuve.

CRISTALLISOIR numéro	POLLEN à 5 p. 100 gouttes	JUS PRÉPARÉ actif	JUS NEUF	JUS INACTIVÉ à	LYSE au bout de 2 heures	AGGLUTINATION au bout de 2 heures	LYSE au bout de 18 heures	AGGLUTINATION au bout de 18 heures
1	V	»	»	56°—30 minutes X gouttes.	»	»	»	»
2	V	»	V gouttes.	56°—30 minutes V gouttes.	»	»	»	»
3	V	»	»	56°—45 minutes X gouttes.	»	»	»	»
4	V	»	V gouttes.	56°—45 minutes V gouttes.	»	»	Commence.	Nette au microscope.
5	V	»	»	45°—30 minutes X gouttes.	»	»	»	»
6	V	»	V gouttes.	45°—30 minutes V gouttes.	»	»	Commence.	Nette au microscope.
7	V	»	»	45°—15 minutes X gouttes.	»	»	Présente.	Présente.
8	V	»	V gouttes.	45°—15 minutes V gouttes.	»	»	Présente.	Présente.
9	V	X gouttes.	»	»	Très nette.	Très nette.	Très nette.	Très nette.
10	V	»	X gouttes.	»	»	»	»	»

obtenu au bout de quatre jours un jus qui lyse le pollen du lis, et qui reste inactif vis-à-vis du pollen d'autres liliacées, *Agapanthus*, et autres espèces sauvages non déterminées. Ce jus est encore inactif pour le pollen de *Polianthes tuberosa* (Amaryllidée), mais, chose curieuse, actif vis-à-vis du pollen de *Gladiolus* (Iridée). Il n'y a donc pas, dans le cas d'inoculation de pollen de lis, production de pollenolysines spécifiques pour la famille, comme cela semble être le cas pour les anticorps produits à la suite d'inoculation de pollen de maïs.

Conclusions.

Des faits que nous venons de relater on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Par l'inoculation d'antigènes appropriés, on peut provoquer, chez les végétaux, la production d'anticorps ;

2° L'inoculation de pollen peut provoquer à la fois la formation de cytolysines et d'agglutinines ;

3° Les propriétés cytolytiques se perdent par chauffage d'une demi-heure à 45°, mais réapparaissent par addition de jus de plante neuve qui joue le rôle d'une alexine ;

4° Les cytolysines et agglutinines ne sont pas spécifiques, mais « de groupe » ;

5° Les pollenolysines expérimentales semblent jouir d'une spécificité relative plus marquée que celle des polleno-agglutinines.

(Travail du laboratoire de l'hôpital San José, Costa-Rica.)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TABLE GÉNÉRALE ALPHABÉTIQUE

PAR NOMS D'AUTEURS

DES TOMES XXXI A XXXV

TABLE ANALYTIQUE

DES SUJETS TRAITÉS

DANS LES TOMES XXXI A XXXV

TxU

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.